



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 15/38, 15/45, C07K 14/03, 14/055, 14/125, 14/165, A61K 39/17, 39/215, 39/245, 39/255</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/27215</p> <p>(43) Date de publication internationale: 25 juin 1998 (25.06.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02307</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 décembre 1997 (15.12.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/15687 16 décembre 1996 (16.12.96) FR</p> <p>(71) Déposant: MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs: AUDONNET, Jean-Christophe, Francis; 130, rue Duguesclin, F-69006 Lyon (FR). BUBLOT, Michel, Joseph, Marie; 18 bis, rue Sartoretti, F-69290 Saint-Genis-les-Ollières (FR). LAPLACE, Eliane, Louise, Françoise; 4, boulevard du Général de Gaulle, F-69600 Oullins (FR).</p> <p>(74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>

(54) Title: LIVE RECOMBINANT AVIAN VACCINE, USING THE INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS AVIAN VIRUS AS VECTOR

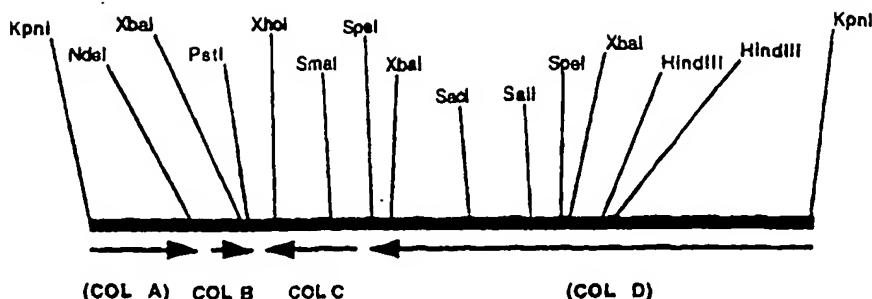
(54) Titre: VACCIN VIVANT RECOMBINANT AVIAIRE, UTILISANT COMME VECTEUR LE VIRUS DE LA LARYNGOTRACHEITE INFECTIEUSE AVIAIRE

The invention concerns a live re-combinant avian vaccine containing, as vector, an ILTV virus comprising and expressing at least a heterologous nucleotide sequence, said sequence being inserted in the insertion locus formed by the IRES (internal ribosome entry site) located between the stop coding units of COL B and COL C of the ILTV and which, in a particular ILTV strain, is defined between nucleotides 908 and 994 at the SEQ ID NO: 1.

(57) Abrégé

Un vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL B et COL C d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 908 et 994 à la SEQ ID NO: 1.

CLONED FRAGMENT
Fragment cloné



Partie séquencée (4161 pb)
SEQUENCED PART (4161 pb)

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
HJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Vaccin vivant recombinant aviaire, utilisant comme vecteur le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire.

La présente invention a trait à des vaccins à usage aviaire à base de virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV), dans lequel a été insérée, par recombinaison génétique, au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, dans des conditions assurant une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre ledit agent pathogène.

Le virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV) est un alphaherpèsvirus (B. Roizman, *Arch. Virol.* 1992. 123. 425-449) qui provoque une pathologie respiratoire importante (la laryngotrachéite infectieuse ou ILT) chez le poulet (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th edn 1991. pp 485-495. Ames, Iowa State University Press). Les vaccins actuellement disponibles contre cette affection contiennent une souche atténuée administrable par différentes voies dont les voies intranasales, conjonctivales.

cloacales, dans l'eau de boisson et par aérosol (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th Edition 1991, pp 485-495. Ames, Iowa State University Press).

Les études de biologie moléculaire du virus ILTV ont permis de caractériser le génome viral (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1991. 119. 181-198) et d'identifier
5 quelques gènes du virus (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. 70. 3085-3089) dont les gènes codant pour la thymidine kinase (UL23) (A.M. Griffin et M.E.G. Boursnell, *J. Gen. Virol.* 1990. 71. 841-850; C.L. Keeler *et al.*, *Avian Dis.* 1991. 35. 920-929), la glycoprotéine gB (UL27) (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 393-398; K. Kongsuwan *et al.*, *Virology* 1991. 184. 404-410; D.J. Poulsen *et al.*, *Virus Genes* 1991.
10 5. 335-347), la glycoprotéine gC (UL44) (D.H. Kingsley *et al.*, *Virology* 1994. 203. 336-343), la protéine de capside p40 (UL26) (A.M. Griffin, *Nucl. Acids Res.* 1990. 18. 3664), la protéine homologue de la protéine ICP4 de l'herpès simplex (HSV-1) (M.A. Johnson *et al.*, *Virus Research* 1995. 35. 193-204), les protéines homologues aux protéines ICP27 (UL54), glycoprotéine gK (UL53) et DNA hélicase (UL52) de l'HSV-1
15 (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. 140. 623-634), la ribonucléotide réductase (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. 70. 3085-3089, WO-A-90/02802), les gènes UL1 à UL5 (W. Fuchs et T.C. Mettenleiter, *J. Gen. Virol.* 1996. 77. 2221-2229), les gènes présents dans la séquence unique courte du génome (U_s) (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence- The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194; K.
20 Kongsuwan *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. 140. 27-39; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Research* 1993. 29. 125-140; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Gene* 1993. 7. 297-303; M.A. Wild *et al.*, *Virus Genes* 1996. 12. 107-116; WO-A-92/03554; WO-A-95/08622).

La présente invention a pour objectif de mettre au point un vaccin aviaire à base de virus ILTV recombinant exprimant un gène hétérologue, ce virus étant capable de se
25 répliquer et d'induire une immunité chez l'hôte vacciné tout en conservant une bonne innocuité.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit en même temps particulièrement efficace contre la laryngotrachéite infectieuse (ILT).

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable
30 dans la vaccination de masse par voie mucosale, par exemple par voie aérosol ou dans l'eau de boisson, de telle manière que la réplication du virus au niveau mucosal permette

d'induire une immunité mucosale et systémique. Une telle immunité mucosale sera particulièrement efficace pour lutter contre les maladies respiratoires, ainsi que contre les autres maladies pour lesquelles la porte d'entrée de l'agent pathogène est mucosale.

5 Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable aussi bien chez les adultes que chez les jeunes animaux.

Un objectif spécifique est de proposer un tel vaccin utilisable dans la vaccination de masse par voie mucosale des tout jeunes animaux tels que les poussins d'un jour.

10 Un autre objectif de l'invention est de proposer un vaccin contre l'ILT qui ait une efficacité accrue par rapport à la souche parentale et qui puisse même éventuellement permettre l'insertion et l'expression d'un gène hétérologue.

Au cours de leurs travaux sur le virus ILTV, les inventeurs ont trouvé une région génomique qui s'est révélée tout à fait appropriée comme site d'insertion de gènes hétérologues. Cela a permis de mettre au point un vaccin vivant recombinant à base d'un

15 vecteur ILTV dans lequel est insérée au moins une séquence codant pour un immunogène aviaire, en particulier les protéines HN et F du virus de la maladie de Newcastle (NDV), et/ou la glycoprotéine gB du virus de la maladie de Marek (MDV), et/ou la protéine VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV), et/ou les protéines S et M du virus de la

20 bronchite infectieuse (IBV). Un tel vaccin incorporant une séquence codant pour des protéines du NDV, du MDV et/ou de l'IBV assure une protection satisfaisante des animaux contre la maladie de Newcastle, contre la maladie de Marek, contre la maladie de Gumboro, et contre la bronchite infectieuse respectivement.

La présente invention a donc pour objet un vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, le virus ILTV comprenant au moins une séquence

25 nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans le locus d'insertion formé de l'intergène situé entre les codons "stop" des COL-B et COL-C du virus ILTV et qui, dans une souche ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 908 et 994 à la séquence SEQ ID NO:1.

Si la séquence particulière décrite dans la demande (SEQ ID NO:1) provient de la souche vaccinale d'ILTV T-20 12-8-66 provenant de Select Laboratories (10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA), il est bien évident que l'homme du métier pourra utiliser les autres souches d'ILTV, compte-tenu des informations données dans la présente sur la souche vaccinale.

Les COL-B et COL-C correspondent respectivement aux gènes UL3.5 et UL4 décrits dans l'article de W. Fuchs et T.C. Mettenleiter (*J. Gen. Virol.* 1996. 77. 2221-2229) d'une souche pathogène provenant de D. Lütticken, Boxmeer, Pays-Bas. Cet article ne suggère en aucune manière que cet intergène puisse être utilisé comme locus d'insertion.

La séquence référencée SEQ ID NO:19 reproduit pour cette souche pathogène, la séquence équivalente à SEQ ID NO:1. L'intergène servant de locus d'insertion conformément à l'invention est compris à la SEQ ID NO:19 entre les nucléotides 908 et 994.

Par séquence hétérologue, on entend une séquence qui ne provient pas de ce locus d'insertion, c'est-à-dire aussi bien une séquence n'ayant pas pour origine le virus ILTV, qu'une séquence provenant d'une autre région génomique de ce virus, ou encore provenant d'une autre souche ILTV, notamment une souche virulente.

Par insertion dans la région d'insertion, on entend notamment insertion simple ou après délétion totale ou partielle du locus d'insertion.

On peut insérer une ou plusieurs cassettes d'expression chacune comprenant au moins une séquence à exprimer.

Pour exprimer la séquence insérée, on préfère utiliser un promoteur eucaryote fort tel que le promoteur CMV immediate early (IE), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), et le promoteur précoce du virus SV40. Par promoteur CMV immediate early (IE), on entend notamment le fragment donné dans les exemples ainsi que ses sous-fragments conservant la même activité promotrice. Le promoteur CMV IE peut être le promoteur humain (HCMV IE) ou le promoteur murin (MCMV IE), ou encore un promoteur CMV IE d'une autre origine, par exemple du singe, du rat, du cobaye ou du porc.

D'autres promoteurs d'origine virale ou cellulaire peuvent également être utilisés.

virus ILTV (gènes considérés comme précoce-immédiats (ICP4, ICP27, ...), précoces (thymidine kinase, DNA helicase, ribonucléotide réductase, ...), ou tardifs (gB, gD, gC, gK, ...)), du virus de la maladie de Marek (MDV) (gènes gB, gC, pp38, pp14, ICP4, Meq,...) ou du virus de l'herpès de la dinde (herpèsvirus of turkey) (gènes gB, gC, ICP4, ...).

La séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV pour être exprimée peut être toute séquence codant pour un polypeptide antigénique, d'un agent pathogène aviaire, capable, une fois exprimé dans les conditions favorables procurées par l'invention, d'assurer une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre l'agent pathogène. On pourra donc insérer, dans les conditions de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour les antigènes d'intérêt pour une maladie donnée.

Cette séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV peut également coder pour un polypeptide immunomodulateur, et notamment une cytokine.

De manière remarquable, les vaccins selon l'invention pourront être utilisés pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration pourront être utilisées: la voie parentérale, ou les voies mucosales telles que oronasale (eau de boisson, aérosol), conjonctivale (goutte dans l'oeil) ou cloacale, avec une préférence pour les voies permettant une vaccination mucoale de masse (eau de boisson, aérosol).

L'invention se révèle particulièrement utile aussi bien pour la protection contre les pathologies respiratoires que contre les pathologies systémiques en bloquant les voies d'entrée naturelles de l'agent pathogène.

L'invention peut notamment être utilisée pour l'insertion d'une séquence nucléotidique codant convenablement pour une protéine antigénique du virus NDV et en particulier, la glycoprotéine HN ou la glycoprotéine F. On obtient ainsi un vaccin vivant recombinant assurant, en plus d'une protection contre la laryngotrachéite infectieuse, une protection satisfaisante contre la maladie de Newcastle.

Le vaccin recombinant contre la maladie de Newcastle contiendra de préférence de 10^4 à 10^6 PFU/dose.

D'autres cas préférés de l'invention sont l'insertion de séquences nucléotidiques

codant pour des antigènes d'autres agents pathogènes aviaires, et notamment, mais de manière non limitative, des antigènes du virus de la maladie de Marek, en particulier gènes gB, gC, gD, et gH+gL (WO-A-90/02803), du virus de la maladie de Gumboro, en particulier gène VP2, du virus de la bronchite infectieuse (IBV), en particulier gènes S et M (M. Binns *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1985. 66. 719-726 ; M. Boursnell *et al.*, *Virus Research* 1984. 1. 303-313), du virus de l'anémie du poulet (CAV), en particulier VP1 (52 kDa) + VP2 (24 kDa) (N.H.M. Noteborn *et al.*, *J. Virol.* 1991. 65. 3131-3139), du virus ILTV, en particulier les gènes codant pour gB (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194. Harwood Academic Publishers GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. 7. 297-303), et du virus du syndrome infectieux du gonflement de la tête ("swollen head syndrome" ou pneumovirose du poulet ou turkey rhinotracheitis virus (TRTV) de la dinde; pneumovirus), en particulier la glycoprotéine de fusion F (Q. Yu *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 75-81), ou la glycoprotéine d'attachement G (R. Ling *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1992. 73. 1709-1715; K. Juhasz et J. Easton, *J. Gen. Virol.* 1994. 75. 2873-2880). Les doses seront de préférence les mêmes que celles pour le vaccin de Newcastle.

Dans le cadre de la présente invention, on peut bien entendu insérer plus d'une séquence hétérologue dans le même virus ILTV, notamment dans ce locus. On peut notamment y insérer des séquences provenant d'un même virus ou de virus différents, ce qui comprend également l'insertion de séquences d'ILTV et d'un autre virus aviaire. On peut également y associer des séquences codant pour des immunomodulateurs, et en particulier des cytokines.

Par exemple, on associe au promoteur CMV IE un autre promoteur de façon que leurs extrémités 5' soient adjacentes (ce qui implique des transcriptions dans des sens opposés), ce qui permet d'insérer, dans la zone d'insertion, deux séquences nucléotidiques, l'une sous la dépendance du promoteur CMV IE, l'autre sous celle du promoteur associé. Cette construction est remarquable par le fait que la présence du promoteur CMV IE, et notamment de sa partie activatrice (enhancer), active la transcription induite par le promoteur associé. Le promoteur associé peut être en particulier un promoteur d'un gène du virus ILTV ou du virus MDV ou HVT.

Un cas intéressant de l'invention est un vaccin comprenant une séquence nucléotidique codant pour HN de NDV et une séquence nucléotidique codant pour F de NDV ou un antigène d'une autre maladie aviaire, notamment celles citées plus haut, l'un des gènes étant sous le contrôle du promoteur CMV IE, et l'autre sous le contrôle du promoteur associé.

On peut aussi monter deux promoteurs CMV IE d'origines différentes avec leurs extrémités 5' adjacentes.

L'expression de plusieurs gènes hétérologues insérés dans le locus d'insertion peut également être rendu possible par insertion entre les cadres ouverts de lecture de ces gènes d'une séquence appelée "IRES" (Internal Ribosome Entry Site) provenant notamment d'un picornavirus tel le virus de la maladie vésiculaire du porc (swine vesicular disease virus, SVDV; B.-F. Chen *et al.*, *J. Virology*, 1993, 67, 2142-2148), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV; R.J. Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 4485-4490), le virus de la fièvre aphteuse (FMDV; N. Luz et E. Beck, *J. Virology*, 1991, 65, 6486-6494), ou encore d'une autre origine. Le contenu des 3 articles cités est incorporé par référence. La cassette d'expression de deux gènes aurait donc la structure minimale suivante: promoteur - gène 1 - IRES - gène 2 - signal de polyadénylation. Le vaccin vivant recombinant selon l'invention pourra donc comprendre, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES, et un signal de polyadénylation.

En plus de l'insertion dans le locus selon l'invention, on peut réaliser une ou plusieurs autres insertions, une ou plusieurs mutations, ou une ou plusieurs délétions ailleurs dans le génome; si la souche parentale est virulente, on peut par exemple inactiver (par délétion, insertion ou mutation) des gènes impliqués dans la virulence tels que le gène thymidine kinase, le gène ribonucléotide réductase, le gène gE.... Dans tous les cas, l'insertion dans un autre locus que celui décrit dans l'invention, permet d'exprimer d'autres gènes.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin contre l'ILT comprenant un virus ILTV recombinant dans lequel on a inséré en amont des gènes codant pour des immunogènes majeurs de l'ILTV, de préférence les gènes codant pour gB (A.M. Griffin,

J. Gen. Virol. 1991. 72. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194. Harwood Academic Publishers GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. 7. 297-303), un promoteur exogène, en particulier un promoteur fort tel que décrit plus haut.

5 Cela permet d'augmenter le niveau d'expression de l'un ou plusieurs de ces gènes et ainsi conduire à un vaccin à efficacité accrue contre l'ILT. On peut bien sûr combiner cela avec une construction telle que décrite plus haut comprenant l'insertion d'une séquence hétérologue dans le locus d'insertion.

10 La présente invention a aussi pour objet une formule de vaccin multivalent, comprenant, en mélange ou à mélanger, un vaccin tel que défini plus haut avec un autre vaccin, et notamment un autre vaccin vivant recombinant aviaire tel que défini plus haut, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes, notamment de pathogènes différents.

15 La présente invention a aussi pour objet une méthode de préparation des vaccins selon l'invention, telle qu'elle ressort de la description.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de vaccination aviaire comprenant l'administration d'un vaccin vivant recombinant ou d'une formule de vaccin multivalent tel que défini plus haut. Elle a notamment pour objet une telle méthode pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration du vaccin peuvent être utilisées (voir plus haut) avec une préférence pour les voies permettant une vaccination de masse par voie mucosale (aérosol, eau de boisson), la dose de vaccin étant choisie de préférence entre 10^1 et 10^4 par animal.

20

La présente invention a aussi pour objet un virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue telle que décrite ci-dessus insérée dans le locus d'insertion tel que défini plus haut.

25

-9-

La présente invention a aussi pour objet tout ou partie de la
séquence SEQ ID NO : 1 ; par parties de cette séquence, on
entend non seulement les COL caractérisés pris isolément ou
leurs fragments, mais aussi l'intergène situé entre les COL B
5 et COL C et les fragments situés de part et d'autre de cet
intergène, pouvant éventuellement inclure une partie de cet
intergène, et qui pourront servir de bras flanquants pour une
recombinaison homologue, technique par ailleurs parfaitement
connue de l'homme du métier. De manière générale, mais sans que
10 cela soit limitatif, les bras flanquants peuvent avoir de 100
à 800 paires de bases.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'ai-
de d'exemples de réalisation non limitatifs, pris en référen-
ce au dessin, dans lequel :

- Figure 1 : Carte de restriction du fragment cloné et position des COLs
- Figure 2 : Séquence de 4161 pb et traduction des COLs A, B, C et D de la souche vaccinale T-20 de Select Laboratories (Vaccin LT BLEN)
- Figure 3 : Schéma d'obtention du plasmide pEL157
- 5 Figure 4 : Schéma d'obtention du plasmide pEL024
- Figure 5 : Schéma d'obtention du plasmide pEL027
- Figure 6 : Schéma du plasmide pEL158
- Figure 7 : Schéma d'obtention du plasmide pCD009
- Figure 8 : Schéma d'obtention du plasmide pEL070
- 10 Figure 9 : Schéma du plasmide pEL159
- Figure 10 : séquence du gène HN du NDV
- Figure 11 : Schéma d'obtention du plasmide pEL030
- Figure 12 : Schéma du plasmide pEL160
- Figure 13 : Schéma du plasmide pEL033
- 15 Figure 14 : Schéma du plasmide pEL161
- Figure 15 : Schéma de double cassette d'expression
- Figure 16 : Schéma du plasmide pCD011
- Figure 17 : Schéma du plasmide pEL163
- 20 Figure 18 : Séquence de 4161 pb et traduction des UL3, 3.5, 4 et 5 de la souche pathogène de Lünticken

Liste des séquences :

- | | |
|----------------|--|
| SEQ ID NO:1 | Séquence du fragment <i>KpnI-KpnI</i> (4161 pb, voir figure 2) |
| SEQ ID NO:2 | Oligonucléotide EL001 |
| SEQ ID NO:3 | Oligonucléotide EL002 |
| 25 SEQ ID NO:4 | Oligonucléotide EL003 |
| SEQ ID NO:5 | Oligonucléotide EL004 |
| SEQ ID NO:6 | Oligonucléotide MB070 |
| SEQ ID NO:7 | Oligonucléotide MB071 |

	SEQ ID NO:8	Séquence du gène HN du NDV (voir figure 10)
	SEQ ID NO:9	Oligonucléotide EL071
	SEQ ID NO:10	Oligonucléotide EL073
	SEQ ID NO:11	Oligonucléotide EL074
5	SEQ ID NO:12	Oligonucléotide EL075
	SEQ ID NO:13	Oligonucléotide EL076
	SEQ ID NO:14	Oligonucléotide EL077
	SEQ ID NO:15	Oligonucléotide CD001
	SEQ ID NO:16	Oligonucléotide CD002
10	SEQ ID NO:17	Oligonucléotide CD003
	SEQ ID NO:18	Oligonucléotide CD004
	SEQ ID NO:19	Séquence du fragment <i>KpnI-KpnI</i> (4161 pb, voir figure 18)

EXEMPLES

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques
15 standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "Geneclean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Le virus utilisé comme virus parental peut être choisi parmi les souches vaccinales
20 décrites dans J.R. Andreasen *et al.* (*Avian Diseases* 1990. 34. 646-656) ou la souche T-20 12-8-66 provenant de Select laboratories 10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA. On peut également utiliser des souches virulentes telles que la souche de Lüticken (voir ci-dessus), la souche N-71851 (ATCC VR-783) ou la souche 83-2 de l'USDA, que l'on peut atténuer par les techniques connues, par exemple celle
25 décrite dans WO-A-95/08622.

Exemple 1: Culture du virus ILTV:

Le virus ILTV (souche T20 de Select Laboratories) est cultivé sur des cellules primaires de reins de poulet (GDF).

complémenté avec 3% de sérum de veau foetal (SVF) dans des flacons de culture de 75 cm² (2 10⁵ cellules/cm²) un ou deux jours avant inoculation.

Le jour de l'inoculation, un flacon de 1000 doses de vaccin lyophilisé est resuspendu dans 10 ml de milieu MEM complémenté avec 1% de SVF; environ 0,5 ml de cette solution est ensuite déposé sur la culture de CRP. Le lendemain, le milieu est changé, et le surlendemain, lorsque l'effet cytopathogène (ECP) se généralise, les flacons de culture sont congelés à -70°C.

La culture du virus ILTV peut également être faite sur des cellules immortalisées de foie de poulet, et notamment sur la lignée LMH (W.M. Schnitzlein *et al.*, *Avian Diseases* 1994. 38. 211-217).

Exemple 2: Préparation de l'ADN génomique de l'ILTV:

Après 2 cycles de congélation/décongélation, la culture d'ILTV (2 flacons de 75 cm²) est récoltée et centrifugée à basse vitesse (5000 tr/min dans un rotor 20, centrifugeuse Beckman JA21, pendant 5 minutes) pour éliminer les gros débris cellulaires. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé (100000 tr/min rotor TLA100.3, centrifugeuse Beckman TL100, pendant 1 heure). Le culot est alors repris dans 1,6 ml de TEN-SDS (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 1mM; NaCl 0,5M; sodium dodecyl sulfate 0,5%), et 35 µl d'une solution de protéinase K à 20 mg/ml sont ensuite ajoutés; la solution est incubée 3 à 4 heures au bain marie à 37°C, et l'ADN est ensuite extrait 3 fois au phénol/chloroforme et 1 fois au chloroforme, puis il est précipité à l'éthanol à -20°C. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 200 µl TE (Tris pH8.0 10mM; EDTA 1mM). La concentration en acide nucléique est ensuite dosée au spectrophotomètre (DO₂₆₀). L'ADN peut être directement digéré par les enzymes de restriction appropriées, pour être ensuite cloné dans le plasmide pBlue Script II SK⁺; de même, il pourra également être utilisé dans les expériences de transfection pour l'obtention d'un virus recombinant.

Exemple 3: Isolement et purification de virus recombinant ILTV

Le plasmide donneur composé d'une cassette d'expression d'un polypeptide inséré entre deux régions flanquantes du locus d'insertion est digéré par une enzyme de restriction

permettant la linéarisation du plasmide, puis il est extrait avec un mélange phénol/chloroforme, précipité avec de l'éthanol absolu, et repris dans de l'eau stérile. Des cellules CRP primaires de 24 heures sont ensuite transfectées avec le mélange suivant: 0,2 à 1 μg de plasmide donneur linéarisé + 2 à 5 μg d'ADN viral d'ILTV

5 (préparé comme dans l'exemple 2) dans 300 μl de milieu OptiMEM (Gibco BRL Cat# 041-01985H) et 100 μg de LipofectAMINE dilués dans 300 μl de milieu (volume final du mélange = 600 μl). Ces 600 μl sont ensuite dilués dans 3 ml (volume final) de milieu et étalés sur $5 \cdot 10^6$ CRP. Le mélange est laissé en contact avec les cellules pendant 5 heures, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les cellules sont alors

10 laissées en culture pendant 3 à 8 jours à + 37°C, puis, lorsque l'effet cytopathogène est apparu, elles sont congelées à -70°C. Après décongelation et éventuellement sonication, cette population virale est clonée en dilution limite en microplaques (96 puits) afin d'isoler une population homogène de virus recombinant. Ces plaques sont laissées en culture pendant 1 à 3 jours, puis le surnageant est récolté dans une plaque 96 puits vide

15 et la plaque contenant les surnageants est placée à 4°C ou à -70°C. Les cellules restant dans les autres plaques sont ensuite fixées à l'acétone 95% pendant 20 à 30 minutes à -20°C, ou pendant 5 minutes à température ambiante. Une réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre le polypeptide exprimé pour rechercher les plaques exprimant ce polypeptide. Un

20 nouveau clonage est ensuite effectué de la même manière (en dilution limite en plaques 96 puits) à partir du surnageant présent dans les cupules des plaques mises à 4°C ou à -70°C et correspondant aux cupules présentant des plages positives en IFI. En général, 4 cycles d'isolement successifs (dilution limite, récolte du surnageant, contrôle des cellules par IFI, dilution limite à partir du surnageant...) suffisent pour obtenir des virus

25 recombinants dont la totalité de la progénie présente une fluorescence spécifique. L'ADN génomique de ces virus recombinants est caractérisé au niveau moléculaire par des techniques classiques de PCR et de Southern blot en utilisant les oligonucléotides et les sondes d'ADN appropriés.

30 L'isolement de virus recombinant peut également se faire par hybridation avec une sonde spécifique de la cassette d'expression insérée. Pour cela, la population virale récoltée après transfection est diluée et déposée sur des cellules CRP (cultivées en boîte de Petri)

de manière à obtenir des plages isolées. Après un contact d'1 heure à 37°C, le milieu d'infection est éliminé et remplacé par 5 ml de milieu MEM à 1 % d'agarose, maintenu en surfusion à 42°C. Lorsque l'agarose est solidifié, les boîtes sont incubées 48 à 72 heures à 37°C en étuve CO₂ jusqu'à apparition de plages. La couche d'agarose est alors éliminée et un transfert des plages virales est réalisé sur une membrane stérile de nitrocellulose de même diamètre que la boîte de Petri ayant servi à la culture. Cette membrane est elle-même transférée sur une autre membrane de nitrocellulose de manière à obtenir une "copie" inversée du premier transfert. Les plages transférées sur cette dernière copie sont alors hybridées, selon les techniques usuelles connues de l'homme de l'art, avec un fragment d'ADN de la cassette d'expression marqué à la digoxigénine (DNA Labelling Kit, Boehringer Mannheim, CAT # 1175033). Après hybridation, lavages et mise en contact avec le substrat de révélation, la membrane de nitrocellulose est mise en contact avec un film autoradiographique. Les images d'hybridation positive sur cette membrane indiquent quelles sont les plages qui contiennent des virus ILTV recombinants ayant inséré la cassette d'expression. Les plages correspondant à ces plages positives sont découpées stérilement sur la première membrane de nitrocellulose, placées dans un tube Eppendorf contenant 0,5 ml de milieu MEM et soniquées pour libérer les virions de la membrane. Le milieu contenu dans le tube Eppendorf est ensuite dilué en milieu MEM et les dilutions ainsi obtenues servent à infecter de nouvelles cultures de cellules CRP.

Exemple 4: Clonage et caractérisation d'une région génomique de l'ILTV

L'ADN extrait du virus ILTV a été digéré par l'enzyme de restriction *KpnI* pendant 2 heures à 37°C. L'enzyme de restriction a ensuite été éliminé par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les fragments résultant de cette digestion ont ensuite été ligaturés (une nuit à 14°C) avec le plasmide pBlueScriptII SK+ (pBS SK+; Stratagene) digéré par *KpnI* et traité à la phosphatase alcaline ; l'analyse des clones obtenus après transformation de bactéries *E. coli* DH5α et culture sur boîtes de milieu complémenté en ampicilline a permis d'identifier des inserts *KpnI*-*KpnI* de tailles différentes, dont un fragment d'environ 4,2 kb (plasmide pEL112).

Le séquençage complet de l'insert présent dans pEL112 (voir figure 1) a permis de mettre en évidence deux cadres ouverts de lecture (COLs) complets (COL B et COL C), et une grande partie de deux autres COLs (COL A et COL D). La carte de restriction de cette région génomique clonée et séquencée, est montrée à la figure 1; la séquence de 4161 pb (SEQ ID NO:1) est montrée à la figure 2. La position et la séquence en acides aminés des COLs A, B, C et D sont également montrées sur les figures 1 et 2 respectivement.

La séquence entre les codons STOP des COL B et C (position de 908 à 994 sur SEQ ID NO:1), est utilisable pour insérer des cassettes d'expression de polypeptides dans le génome de l'ILTV. Cette séquence est appelée locus d'insertion. L'insertion peut se faire avec ou sans délétion dans la région intergénique (voir exemple 5).

Exemple 5: Construction du plasmide donneur pEL157 pour l'insertion dans la région intergénique entre les COLs B et C

Le plasmide pEL112 (7116 pb), a été digéré par les enzyme *NorI* et *SpeI* pour isoler le fragment *NorI-SpeI* de 4,5 kb. Le fragment ainsi digéré a ensuite été traité à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) en présence de dNTP pour rendre les bouts francs ; après ligation et transformation des bactéries *E. coli*, le clone pEL156 (4503 pb) a été obtenu.

Les oligonucléotides EL001 (SEQ ID No:2) et EL002 (SEQ ID No:3) ont servi d'amorce pour une première amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR). Les oligonucléotides EL003 (SEQ ID No:4) et EL004 (SEQ ID No:5) ont servi d'amorce pour une deuxième amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR).

EL001 (SEQ ID No:2) : 5' TATTGCTTTCTACCGAAGTCGG 3'

EL002 (SEQ ID No:3) : 5' ACGCGAATTCAAATACGAGCATTTAATTATTGCG 3'

EL003 (SEQ ID No:4) : 5' TCTCCAGAATCGCTGGAGTGTCC 3'

EL004 (SEQ ID No:5) : 5' TGC GCGAATTCGTAAGCTTTGATATCCAGTCGACA

TAATTTGGTGTTTATTACTTTTA 3'

Les PCR ont été effectuées en présence de tampon PCR, de dNTP, d'ADN du plasmide pEL156, de Taq polymérase, et pour la première PCR, des oligonucléotides EL001 et EL002, et pour la deuxième PCR, des oligonucléotides EL003 et EL004.

- 5 Pour les deux PCR, 25 cycles ont été effectués (30 secondes à 94°C ; 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C). Les produits des deux PCR ont été purifiés par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une purification par l'éthanol. Le produit de la première PCR (EL001/EL002) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Xba*I et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragment d'ADN *Xba*I-*Eco*RI de 120 pb
- 10 qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le produit de la deuxième PCR (EL003/EL004) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Xho*I et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragment d'ADN *Xho*I-*Eco*RI de 85 pb qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le plasmide pEL156 a été digéré par les enzymes *Xba*I et *Xho*I. Les deux fragments de PCR *Xba*I-*Eco*I (120 pb) et *Xho*I-*Eco*RI (85 pb) ont été
- 15 ligaturés une nuit à 14°C avec le plasmide pEL156 digéré par *Xba*I et *Xho*I. Après transformation des bactéries *E. coli*, et culture sur boîtes de milieu complété en ampicilline, le clone pEL157 (4531 pb), comprenant un polylinker *Eco*RI - *Hind*III - *Eco*RV - *Sal*I a été obtenu (voir schéma d'obtention de pEL157 à la figure 3).

20 Exemple 6: Construction du plasmide donneur pEL158 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur HCMV IE dans le site intergénique entre les COLs B et C, et isolement de vILTV8:

6.1 - Clonage du gène VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV) et construction d'une cassette d'expression de VP2 sous contrôle du promoteur HCMV IE

25 Le plasmide pEL004 (voir figure 4; = plasmide pGH004 décrit dans la demande de brevet français 92.13109) contenant le gène IBDV VP2 sous forme d'une cassette *Bam*HI-*Hind*III a été digéré par *Bam*HI et *Xba*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Xba*I (gène VP2 tronqué) de 1104 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS SK+.

- préalablement digéré avec *XbaI* et *BamHI* pour donner le plasmide pEL022 de 4052 pb (figure 4). Le vecteur pBS-SK+ a été digéré par *EcoRV* et *XbaI*, puis ligaturé sur lui-même pour donner pBS-SK* (modifié). Le plasmide pEL004 a été digéré par *KpnI* et *HindIII* pour isoler le fragment *KpnI-HindIII* de 1387 pb contenant le gène IBDV VP2
- 5 complet. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK*, préalablement digéré par *KpnI* et *HindIII*, pour donner le plasmide pEL023 de 4292 pb (figure 4). Le plasmide pEL022 a été digéré par *BamHI* et *NorI* pour isoler le fragment *BamHI-NorI* de 1122 pb (fragment A). Le plasmide pEL023 a été digéré par *BamHI* et *NorI* pour isoler le fragment *BamHI-NorI* de 333 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés
- 10 ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *NorI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL024 de 4369 pb (figure 4). Le plasmide pEL024 a été digéré par *NorI* pour isoler le fragment *NorI-NorI* de 1445 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMVβ (Clontech Cat# 6177-1, figure 5), préalablement digéré par *NorI*, pour donner le plasmide pEL026 de 5095 pb (figure 5).
- 15 Le plasmide pEL026 a été digéré par *EcoRI*, *SalI* et *XmnI* pour isoler le fragment *EcoRI-SalI* de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *EcoRI* et *SalI*, pour donner le plasmide pEL027 de 5379 pb (figure 5).

6.2 - Construction du plasmide donneur pEL158

- 20 Le plasmide pEL027 a été digéré par *EcoRI*, *SalI* et *XmnI* pour isoler le fragment *EcoRI-SalI* de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL157 (voir exemple 5 et figure 3), préalablement digéré par *EcoRI* et *SalI*, pour donner le plasmide pEL158 de 6950 pb (figure 6).

6.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV8

- 25 Le virus vILTV8 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL158 préalablement linéarisé par l'enzyme *KpnI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette HCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 7: Construction du plasmide donneur pEL159 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur MCMV IE dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement de vILTV9:

7.1 - Construction de pEL070 contenant une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur immediate early (IE) du MCMV (Mouse CytoMegalovirus)

Le plasmide pCMV β (Clontech Cat# 6177-1, figure 7) a été digéré par *Sa*II et *Sma*I pour isoler le fragment *Sa*II-*Sma*I de 3679 pb contenant le gène *lacZ* ainsi que le signal de poly-adénylation du gène tardif du virus SV40. Ce fragment a été inséré dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Sa*II et *Eco*RV, pour donner le plasmide pCD002 de 6625 pb (figure 7). Ce plasmide contient le gène reporter *lacZ* mais aucun promoteur n'est situé en amont de ce gène.

Le virus MCMV souche Smith a été obtenu de l'American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC N° VR-194). Ce virus a été cultivé sur cellules d'embryon de souris Balb/C et l'ADN viral de ce virus a été préparé comme décrit par Ebeling A. et al. (J. Virol. 1983. 47. 421-433). Cet ADN génomique viral a été digéré

par *Pst*I pour isoler le fragment *Pst*I-*Pst*I de 2295 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Pst*I et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pCD004 (figure 7). Le plasmide pCD004 a été digéré par *Hpa*I et *Pst*I pour isoler le fragment *Hpa*I-*Pst*I de 1389 pb qui contient la région promotrice/activatrice du gène Immediate-Early du cytomégaloVirus murin (Murine CytoMegalovirus = MCMV) (Dorsch-Häsler K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. 82. 8325-8329, et demande de brevet WO-A-87/03905). Ce fragment a été cloné dans le plasmide pCD002, préalablement digéré par *Pst*I et *Sma*I, pour donner le plasmide pCD009 de 8007 pb (figure 7).

Un oligonucléotide double brin a été obtenu par hybridation des deux oligonucléotides suivants :

MB070 (SEQ ID NO:6)

5' CGAATTCAGTGTGTGTCTGCAGGCGGCCGCGTGTGTGTCGACGGTAC

3'

MB071 (SEQ ID NO:7)

5' CGTCGACACACACGCGGCCGCCTGCAGACACACACTAGTGAATTCGAGCT

3'

- 5 Cet oligonucléotide double brin a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par KpnI et SacI, pour donner le plasmide pEL067 (figure 8).
- Le plasmide pCD009 a été digéré par *Pst*I et *Spe*I pour isoler le fragment *Pst*I-*Spe*I de 1396 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL067, préalablement digéré par *Pst*I et *Spe*I, pour donner le plasmide pEL068 de 4297 pb (figure 8). Le plasmide
- 10 pEL024 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Nor*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Nor*I de 1390 pb (fragment A). Le plasmide pEL027 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Sal*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Sal*I de 235 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL068, préalablement digéré par *Nor*I et *Sal*I, pour donner
- 15 le plasmide pEL070 de 5908 pb (figure 8). Ce plasmide contient donc une cassette d'expression constituée du promoteur IE du MCMV, du gène VP2 et du signal polyA de SV40.

7.2 - Construction du plasmide donneur pEL159

- Le plasmide pEL070 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 3035 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL157 (voir exemple 5
- 20 et figure 3), préalablement digéré par *Eco*RI et *Sal*I, pour donner le plasmide pEL159 de 7545 pb (figure 9). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/IBDV-VP2 dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV.

7.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV9

- 25 Le virus vILTV9 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL159 préalablement linéarisé par l'enzyme *Bgl*II et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 8: Construction du plasmide donneur pEL160 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement de vILTV10:

8.1 - Clonage du gène HN du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

5 La constitution d'une banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV), souche Texas, a été réalisée comme décrit par Taylor J. *et al.* (J. Virol. 1990. 64. 1441-1450). Un clone pBR322 contenant la fin du gène fusion (F), la totalité du gène hémagglutinine-neuraminidase (HN) et le début du gène de la polymérase a été identifié pHN01. La séquence du gène NDV HN contenue sur ce clone est
10 présentée sur la figure 10 (SEQ ID NO:8). Le plasmide pHN01 a été digéré par *SphI* et *XbaI* pour isoler le fragment *SphI-XbaI* de 2520 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pUC19, préalablement digéré par *SphI* et *XbaI*, pour donner le plasmide pHN02 de 5192 pb. Le plasmide pHN02 a été digéré par *ClaI* et *PstI* pour isoler le fragment *ClaI-PstI* de 700 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides
15 suivants:

EL071 (SEQ ID NO:9) 5' CAGACCAAGCTTCTTAAATCCC 3'

EL073 (SEQ ID NO:10) 5' GTATTCGGGACAATGC 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 270 pb. Ce fragment a été digéré par *HindIII* et *PstI* pour isoler un fragment *HindIII-PstI* de 220 pb (fragment B).

20 Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *HindIII*, pour donner le plasmide pEL028 de 3872 pb (figure 11). Le plasmide pHN02 a été digéré par *BspHI* et *ClaI* pour isoler le fragment *BspHI-ClaI* de 425 pb (fragment C). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL074 (SEQ ID NO:11) 5' GTGACATCACTAGCGTCATCC 3'

25 EL075 (SEQ ID NO:12)

5' CCGCATCATCAGCGGCCGCGATCGGTCATGGACAGT 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 465 pb. Ce fragment a été digéré par *BspHI* et *NorI* pour isoler le fragment *BspHI-NorI* de 390 pb (fragment D). Les fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement

digéré par *ClaI* et *NorI*, pour donner le plasmide pEL029bis de 3727 pb (figure 11). Le plasmide pEL028 a été digéré par *ClaI* et *SacII* pour isoler le fragment *ClaI-SacII* de 960 pb (fragment E). Le plasmide pEL029bis a été digéré par *ClaI* et *NorI* pour isoler le fragment *ClaI-NorI* de 820 pb (fragment F). Les fragments E et F ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *NorI* et *SacII*, pour donner le plasmide pEL030 de 4745 pb (figure 11).

8.2 - Construction du plasmide pEL160 contenant une cassette d'expression de HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs B et C

Le plasmide pEL030 a été digéré par *NorI* pour isoler le fragment *NorI-NorI* de 1780 pb (gène NDV HN entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NorI* du plasmide pEL159 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NorI-NorI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL160 de 7921 pb (figure 12). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/NDV-HN dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV.

8.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV10

Le virus vILTV10 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL160 préalablement linéarisé par l'enzyme *BglI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV HN dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 9: Construction du plasmide donneur pEL161 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement de vILTV11:

9.1 - Clonage du gène F du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

Un clone provenant de la banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (voir exemple 8, paragraphe 8.1) et contenant le gène fusion (F) en entier a été appelé pNDV81. Ce plasmide a été décrit précédemment et la séquence du gène NDV F présent sur ce clone a été publiée (Taylor J. *et al.* J. Virol., 1990, 64,

1441-1450). Le plasmide pNDV81 a été digéré par *NarI* et *PstI* pour isoler le fragment *NarI-PstI* de 1870 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL076 (SEQ ID N° 13) 5' TGACCCTGTCTGGGATGA 3'

5 EL077 (SEQ ID N° 14)

5' GGATCCCGGTCTGACACATTGCGGCCGCAAGATGGGC 3'

et la matrice pNDV81 pour produire un fragment de 160 pb. Ce fragment a été digéré par *PstI* et *SaII* pour isoler le fragment *PstI-SaII* de 130 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Clal* et *SaII*, pour donner le plasmide pEL033 de 4846 pb (figure 13).

9.2 - Construction du plasmide pEL161 contenant une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs B et C

Le plasmide pEL033 a été digéré par *NorI* pour isoler le fragment *NorI-NorI* de 1935 pb (gène F entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NorI* du plasmide pEL159 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NorI-NorI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL161 de 8074 pb (figure 14). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/NDV-F dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV.

9.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV11

20 Le virus vILTV11 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL161 préalablement linéarisé par l'enzyme *BglI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV F dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV (voir exemple 5).

25 Exemple 10: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une double cassette d'expression des gènes HN et F du NDV dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement d'un virus recombinant ILTV:

Une double cassette d'expression de deux gènes, par exemple les gènes HN et F du virus NDV, peut être construite. Une telle construction est schématisée à la figure 15. Dans

cette construction, l'extrémité 5' des deux promoteurs sont adjacentes de manière que la transcription des deux gènes se fasse en sens opposés. Un des deux promoteurs est le promoteur MCMV IE et l'autre promoteur (appelé promoteur associé) est le promoteur SV40 (présent dans le plasmide pSVbeta, Clontech Laboratories, Palo Alto, California 94303-4607, USA). Dans cette configuration, le promoteur associé est activé par la région activatrice du promoteur CMV IE.

Cette double cassette d'expression peut ensuite être insérée dans le plasmide donneur décrit ci-dessus (pEL157 décrit dans l'exemple 5 et représenté dans la figure 3).

L'isolement des virus recombinants se fait de la même manière que ci-dessus (voir exemple 3).

Exemple 11: Construction du plasmide donneur pEL163 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement de vILTV12:

11.1 - Clonage du gène gB du virus de la maladie de Marek

Le fragment *EcoRI-SalI* de 3,9 kpb de l'ADN génomique du virus MDV souche RB1B contenant le gène MDV gB (séquence publiée par Ross N. *et al.* J. Gen. Virol. 1989. 70, 1789-1804) a été ligaturé avec le vecteur pUC13, préalablement digéré par *EcoRI* et *SalI*, pour donner le plasmide pCD007 de 6543 pb (figure 16). Ce plasmide a été digéré par *SacI* et *XbaI* pour isoler le fragment *SacI-XbaI* de 2260 pb (partie centrale du gène gB = fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD001 (SEQ ID NO:15)

5' GACTGGTACCGCGGCCGCATGCACTTTTATAGGCGGAATTG 3'

CD002 (SEQ ID NO:16) 5' TTCGGGACATTTTCGCGG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 222 pb. Ce fragment a été digéré par *KpnI* et *XbaI* pour isoler un fragment *KpnI-XbaI* de 190 pb (extrémité 5' du gène gB = fragment B). Une autre PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD003 (SEQ ID NO:17) 5' TATATGGCGTTAGTCTCC 3'

CD004 (SEQ ID NO:18)

5' TTGCGAGCTCGCGGCCGCTTATTACACAGCATCATCTTCTG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 195 pb. Ce fragment a été

digéré par *SacI* et *SacII* pour isoler le fragment *SacI-SacII* de 162 pb (extrémité 3' du gène gB = fragment C). Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *KpnI* et *SacI*, pour donner le plasmide pCD011 de 5485 pb (figure 16).

5 *11.2 - Construction du plasmide pEL163 contenant une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV*

Le plasmide pCD011 a été digéré par *NorI* pour isoler le fragment *NorI-NorI* de 2608 pb (gène gB MDV entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NorI* du plasmide pEL159 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NorI-NorI* de 1405 pb contenant le gène
10 codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL163 de 8749 pb (figure 17). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/MDV-gB dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV.

11.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV12

Le virus vILTV12 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide
15 pEL161 préalablement linéarisé par l'enzyme *BglI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/MDV gB dans le site intergénique entre les COLs B et C du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 12: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une cassette d'expression de gène(s) de l'IBV dans le site intergénique entre les COLs B et C et isolement de virus recombinant ILTV:

20 Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11) ou pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinants exprimant à un niveau élevé les protéines Membrane (M) ou Spike (S), ou
25 partie de Spike (S1 ou S2), ou Nucléocapside (N) du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV). On réalise notamment une double cassette d'expression avec le gène S sous contrôle du promoteur CMV IE et le gène M sous contrôle du promoteur associé.

Exemple 13: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression de gène(s) d'autres agents pathogènes aviaires ou de peptide immunomodulateur dans le site , décrit, et isolement de virus recombinants ILTV:

- 5 Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11) pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinants exprimant à un niveau élevé des immunogènes du CAV (et notamment une double cassette d'expression des gènes codant pour VP1 et pour VP2), du virus de la
- 10 pneumovirose du poulet, ou d'autres agents pathogènes aviaires, ou encore des peptides immunomodulateurs et notamment des cytokines.

Exemple 14: Production de vaccins:

- Les virus recombinants obtenus selon l'invention sont produits sur oeufs embryonnés. La solution virale récoltée est ensuite diluée dans une solution stabilisatrice pour la
- 15 lyophilisation, répartie à raison de 1000 doses vaccinales par flacon, et enfin lyophilisée.

REVENDICATIONS

1 - Vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé
5 entre les codons stop des COL B et COL C d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 908 et 994 à la SEQ ID NO:1.

2 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la
10 ou les séquences nucléotidiques sont insérées par insertion simple, ou après délétion totale ou partielle du locus d'insertion.

3 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que, pour exprimer la séquence nucléotidique insérée, le vecteur
comprend un promoteur eucaryote fort.

4 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que le
15 promoteur fort est choisi parmi le groupe consistant en: promoteur CMV immediate-early, de préférence le promoteur CMV immediate-early murin ou humain, promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous (RSV), promoteur précoce du virus SV40.

5 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences nucléotidiques insérées dans
20 le locus d'insertion sous le contrôle de promoteurs eucaryotes différents.

6 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que les promoteurs eucaryotes sont des promoteurs CMV immediate-early d'origines animales différentes.

7 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il
25 comprend une première séquence nucléotidique associée au promoteur CMV immediate

early et un autre promoteur sous la dépendance duquel se trouve une autre séquence nucléotidique, ces deux promoteurs étant disposés de manière que leurs extrémités 5' soient adjacentes.

8 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES, et un signal de polyadénylation.

9 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

10 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un antigène d'un agent pathogène aviaire choisi parmi le groupe consistant en le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de la maladie de Gumboro (IBDV), le virus de la maladie de Marek (MDV), le virus de la bronchite infectieuse (IBV), le virus de l'anémie du poulet (CAV), le virus de la pneumovirose du poulet.

11 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides F et HN du virus NDV.

12 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides gB, gC, gD, gH+gL du virus MDV.

13 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe des séquences

correspondant aux antigènes VP2 de l'IBDV, aux antigènes S, ou partie de S, M et N du virus IBV, aux antigènes VP1 et VP2 du CAV, aux antigènes G et F du virus de la pneumovirose du poulet.

5 14 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide immunomodulateur, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

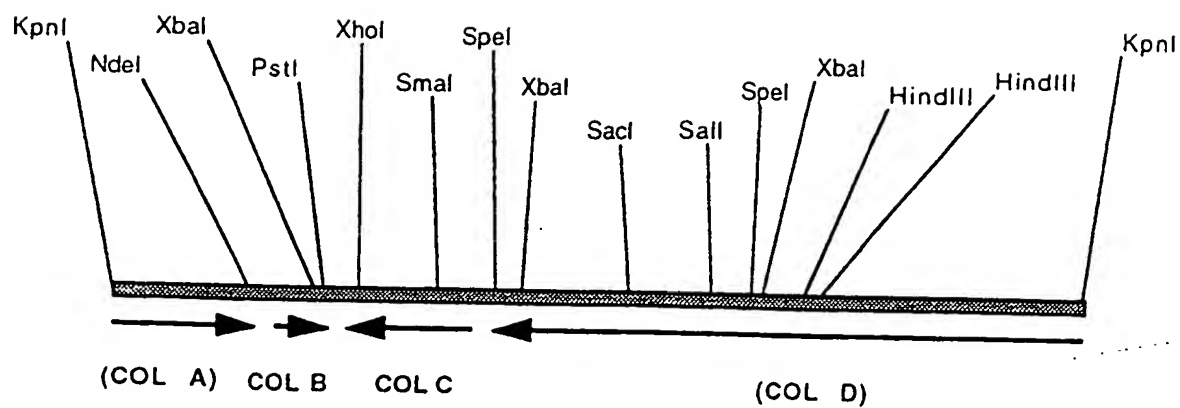
15 15 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que cette séquence nucléotidique est choisie parmi le groupe des séquences codant pour des cytokines.

10 16 - Formule de vaccin multivalent comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes.

15 17 - Un virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL B et COL C d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 908 et 994 à la SEQ ID NO:1.

1/23

Fragment cloné



Partie séquencée (4161 pb)

Fig. 1

2/23

KpnI
COL A

1 GGTACCGAGATCCCCCTCTGTGACAGAAGTTCTATATGGAGCCTCGTCTATTGACTGTGTT
 1▶ GlyThrGluIleProSerValThrGluValLeuTyrGlyAlaSerSerIleAspCysVal
 61 TCCGGATCGTACGAATGTCATGATACGCATTCTCATGTTACTCCGGACCACGCAAAAGAC
 21▶ SerGlySerTyrGluCysHisAspThrHisSerHisValThrProAspHisAlaLysAsp
 121 GTAGCCGTCCAAGGGCATGTCAAAACGAATAACACCGAAGATGTAGAATCTTTGGACTCG
 41▶ ValAlaValGlnGlyHisValLysThrAsnAsnThrGluAspValGluSerLeuAspSer
 181 TGTGGCTTTGACAGTGTTCATGATATTTTCATTCCGGGAAGTCCGGGAGAAGACAGCTT
 61▶ CysGlyPheAspSerValPheMetIlePheSerPheGlyGluLeuGlyArgArgGlnLeu
 241 ACCGATAACATTCGAAAAGACATTTGTACTTCCCTAGACAGAGTTCGGATGGCATGTACT
 81▶ ThrAspAsnIleArgLysAspIleCysThrSerLeuAspArgValProMetAlaCysThr
 301 AAGACGTCCGCATTTGCAGGTGCAAATAGACATCAGAAAAGTTTGAGATGTTTCTCTTT
 101▶ LysThrSerAlaPheAlaGlyAlaAsnArgHisGlnLysSerLeuGlnMetPheLeuPhe
 361 TGCAAGAGAAGACATGCCCCGCAAATAAGGGCTCGCCTAAAAGACATTATTTTCGTCAAGA
 121▶ CysLysArgArgHisAlaProGlnIleArgAlaArgLeuLysAspIleIleSerSerArg
 421 AAGTCAAGAAAATATTTTACGCAGTCCGAGGATGGAGAACTCACCCCGGTGTGCCAGTT
 141▶ LysSerArgLysTyrPheThrGlnSerGluAspGlyGluThrHisProGlyValProVal
 481 TTCTTTACAGAGTTTGTAGCCCATGCCCCGGTATTTATTCACGCGACAATCTTGCCCAT
 161▶ PhePheHisGluPheValAlaHisAlaProValPheIleProArgAspAsnLeuAlaHis

NdeI

541 GCCTGTCGCAGATTGGCCAGGCATATGACTGGAGGAATGGCGTGTTGACTTACGTGGGCG
 181▶ AlaCysArgArgLeuAlaArgHisMetThrGlyGlyMetAlaCys...
 601 CGCCTCTGGGTGGAACCCAGCGCTAGAACATTTATACCTGCCCATTCGGAAGTTACTC

COL B

661 AGAACGCGAATATTGCACTTCCTGGACTATGAAGTACGGTCAGGCTGCTATTGCAACTGA
 1▶ MetLysTyrGlyGlnAlaAlaIleAlaThrAs
 721 TATGGACTTTGCCCCGATGTCTCGCCAGCCTCCACGGAAGAACTCCAGGTGCTCTTCGGC
 11▶ pMetAspPheAlaArgMetSerArgGlnProProArgLysAsnSerArgCysSerSerAl
 781 ACGGACGGCTGCGTTACAGGGTAATGGATATTGCTTTCTACCGAAGTCGGAAAAGTTGCC
 31▶ aArgThrAlaAlaLeuGlnGlyAsnGlyTyrCysPheLeuProLysSerGluLysLeuPr
 841 TGAGCTACCCTCTAGACATTTTCGAGACCCGATTTTCCTCACTACTACCTCCAGCTGCAGC
 51▶ oGluLeuProSerArgHisPheGluThrArgPheSerSerLeuLeuProProAlaAlaAl
 901 TAAGTGACAGCAACTATGAAGGTCAACTCATTTCGCAATGCGACGCAATAATTAAATGC
 71▶ aLys...
 961 TCGTATTTTCATAATTTGGTGTTTATTACTTTTATTTATTCCTCTAACAGTCCGGCATGCC
 179▶ ...GluGluLeuLeuGlyAlaHisAr

XhoI

1021 TTGCCGCAAACCTCTACAAGATCTCGAGGAACGCTTTCCTCTGGACACTCCAGCGATTCTG
 170▶ gAlaAlaPheGluValLeuAspArgProValSerGluGluProCysGluLeuSerGluPr
 1081 GAGAGGATTGGGAACATGTGGGGGTGGTGTGCGCGCTAGATGCTAGATCTTCCGGGGTTT
 150▶ oSerSerGlnSerCysThrProThrThrHisAlaSerSerAlaLeuAspGluProThrGl
 1141 CGTATATGGTTACAGTTAAGTGAGCGACGCCCCAAAAAATTCATCATGGTGATGTTGCCGC
 130▶ uTyrIleThrValThrLeuHisAlaValGlyLeuPheAsnMetMetThrIleAsnGlySe
 1201 TGCTCCACCGTTCTCGCGTTCTCCGCGCCCTAGAAACCAACATGCCGAGAACTGAAAAG
 110▶ rSerTrpArgGluArgThrGlyGlyArgGlyLeuPheTrpCysAlaSerPheGlnPheAl
 1261 CTAATGTTTCTCCTGAGGTCCTCGGTGAGAACCATGCGCTCCAAACAGTATGCCGCAA
 90▶ aLeuThrGluGlySerProGlyArgHisSerGlyAsnArgGluLeuCysTyrAlaCysPh
 1321 ATTCTTCTTCACAGTCTACAGCGATCATTTGTTGCGACGGGATTGTGAATTACTATTACTT
 70▶ eGluGluGluCysAspValAlaIleMetThrAlaValProAsnHisIleValIleVally

3/23

SmaI

1381 TCCCGGGTGGTAATTGGTGGCGATACATTTTATTTCGGATGCAAATAAACCGCATTCCTC
504 sGlyProProLeuGlnHisArgTyrMetLysAsnGlyIleCysIlePheArgMetGlyG1
1441 CATCGCATGAGTATACTACTTGTTCGTATTCCGTGGCCGAGCCATGCCCAAGCCTTGA
304 yAspCysSerTyrValValGlnGluTyrGluThrAlaSerGlyHisGlyLeuGlyGlnVa
COL C
1501 CTCCTACCATTACGTAGCTTATGAAAATCATGTTCTCGGGACGAGGAGGTATGCAACAC
104 lGlyValMetValTyrSerIlePheIleMet
1561 TCCAAACGACGGTGGGAACTGATTTTAAAGCCACGCGTGTGGCTACTTTTGAGGATTAG
8484...T

SpeI

1621 TATACTAGTCGCGTTTCTTTGCATCTGAGCGCGGAAGAATGTGTTGGCTTACTTGTGCA
8464 yrValLeuArgThrGluLysCysArgLeuAlaArgLeuIleHisGlnSerValGlnArgT
1681 GTATCTTCGTATTTTCGTTTCGAGGGGGTTAAGTTCATGCGCAATATTCGCTACTCGTT
8264 hrAspGluTyrLysThrArgLeuProAsnLeuAsnMetArgLeuTyrGluSerSerThrV
XbaI
1741 ACTCTAGACATTGCTACGTATGCAGTATTTAATTTTCATTGTTCCGTGAGAAAAACATATT
8064 alArgSerMetAlaValTyrAlaThrAsnLeuLysMetThrGlyHisSerPheCysIleA
1801 GCTACCCTGTCTAAACTTAACCCTTGAGATCGTGTGATCGTCATTGCAAGGCTCGAAGCTT
7864 laValArgAspLeuSerLeuGlyGlnSerArgThrIleThrMetAlaLeuSerSerSerI
1861 ATTCCGTGGTCAATTGTTATGGCCATCCTTAATTCCTGTCCACCTATATTATCGACAAAA
7664 leGlyHisAspIleThrIleAlaMetArgLeuGluGlnGlyGlyIleAsnAspValPheT
1921 GTTGCTTTGTTATGGCACAGGACTGAAACGAACCCCATTTGATCCCTTACGACAAGCTCTT
7464 hrAlaLysAsnHisCysLeuValSerValPheGlyMetGlnAspArgValValLeuArgP
1981 GGCAAGTCTAGCATTTGTAAAATTGGCTCGGCCCATTCGTGGGCTTTTGAGGTGTCCTCA
7264 roLeuAspLeuMetGlnLeuIleProGluAlaTrpGluHisAlaLysSerThrAspGluA
2041 GCATATCCCGAAATCTTGCTCGCGTAATCCCGCGTAAGGTATATGTGTGCGTTTGAGCA
7064 laTyrGlyProPheArgAlaArgThrIleGlyArgLeuThrTyrThrAspThrGlnAlaA
2101 GCAAATGCACATACTGCTCCCTTGAAACTGGAGATAGAAATTTCTTGACTTGAGAAAGAA
6864 laPheAlaCysValAlaGlyLysPheSerSerIleSerIleGluGlnSerSerPheSerA

SacI

2161 GCCGTTCCGACGAATGAGCTAAAGGGGGCGGCAGTAAATACACTCCCAAGAGCTCACAC
6664 laThrGlyValPheSerSerPheProAlaAlaThrPheValSerGlyPheLeuGluCysL
2221 AGCACCGCGTAACGTAAAGTATAAATTTCTTTTCATCTGCTCGAAATAACTAAATATTCT
6464 euValAlaTyrArgLeuThrTyrIleArgLysMetGlnGluPheTyrSerPheIleGluG
2281 TGACCGTGGACATCGCTCCCGCAAATCTCATAATTTAGATAGAATTGATCTAACGACTTA
6264 lnGlyHisValAspSerGlyCysIleGluTyrAsnLeuTyrPheGlnAspLeuSerLysA
2341 TCAAAAATATCGAATAAATCATCTTTGTTCATTACATCGGCATTCCGACATTATCTTCC
6064 spPheIleAspPheLeuAspAspLysAspAsnValAspAlaAsnProCysGluAspGluA
2401 TTAAACAAAAATTTTACCATTTCCTCATGTCAAAGTTCTGAGTTTCTGGCTCCGGCATT
5864 snPheCysPheLysGluGlyAsnGlyMetAspPheAsnGlnThrGluProGluProMetA
2461 GCTAGGGAGTACAACCTGTACACGCCATTGTTAATTTATCTTCGGGGAGGCCCTCTGTT
5664 laLeuSerTyrLeuArgAspTyrAlaMetThrLeuLysAspGluProLeuGlyGluThrA

SalI

2521 CGGAGAAATTCGTAAAATTTAATCATCCCATAGTATAGCAAGGTCGACAGAAAGTGATAG
5464 rgLeuPheGluTyrPheLysIleMetGlyTyrTyrLeuLeuThrSerLeuPheHisTyrA
2581 GCAAATTTCTACTTTGTCTTCTCCATACGTCTTGAGAAAGCTATCTTCGGATAATACATGT
5264 laPheGluValLysAspGluGlyTyrThrLysLeuPheSerAspGluSerLeuValHisA
2641 GCGAATTTTCAAATGTTCCCTCAAAACCGAAGATCAATTTTTTTACCTTTTTTGTACC
5064 laPheLysGluPheThrGlyGluPheGlyPheIleLeuLysLysValLysLysThrValT

SpeI

2701 GTGATCTGGCTATTGAGTACGTGCCGAGGCATCAGTCGTTACTAGTGTATATTCATTACTC
4864 hrIleGlnSerAsnLeuValHisSerAlaAspThrThrValLeuThrTyrGluAsnSerG

XbaI

2761 TCATCTCGATGGTATTCAAATCTGGCGCGGTCACATCTAGATCCCTGCTCTGTGAATAG
4664 luAspArgHisTyrGluPheArgProAlaThrValAspLeuAspArgSerGlnSerTyrA
2821 TTTCCAAGCGGAGAGGAATTGTTTTCAGCCAGCGATCAATATTTAGTGTCTCTTGACCC

4/23

2881 GTCAGGGATTATATACTTTTCAAATGCCGCCATATCTACTATTGTATACATCGGCAGGAGA
426 hrLeuSerLysTyrLysGluPheAlaAlaMetAspValIleThrTyrMetProLeuLeuP
HindIII

2941 AATACCCCTATATTTTTTCAGATTTCTGTGCACGAAGCTTTGCGTGCAATTTAGAAACGTAT
406 heValArgTyrLysGluSerLysGlnAlaArgLeuLysAlaHisLeuLysSerValTyrG
HindIII

3001 TCTTTAACTTCTTCGTGGGACGAGAAAAAGCCTAGTCCATCCAGGAAGCTTTGATGGATCT
386 luLysValGluGluHisSerSerPheLeuArgThrTrpGlyProLeuLysSerProAspL

3061 TTGATGAATGATTCTGATACAACTGACTGATCTAAGAATCTGGCATGGCGTTTGTCAAA
366 ysIlePheSerGluSerValIlePheGlnAspLeuPheArgAlaHisArgLysThrLeuP

3121 GGTAACCCAAATTCAAATGCCTTTAATACTTCTCCGAAAGCAGGCTCCGAGCATCGTTTA
346 roLeuGlyPheGluPheAlaLysLeuValGluGlyPheAlaProGluSerCysArgLysA

3181 TTATTAATAAAGATGGCCCACTGCTTCTTGATATTCAGGACTGAAAACAGTGTAGGAGTA
326 snAsnIlePheIleAlaTrpGlnLysLysIleAsnLeuValSerPheLeuThrProThrC

3241 CAAATAAGATTACTTAAATGTTTATGCTGCTGGATATAAGGTGTCGTTGATTTCTGTGC
306 ysIleLeuAsnSerLeuIleAsnIleSerSerSerIleLeuHisArgGlnAsnArgHisG

3301 TCGAAGCTGCTTTCCATTGCGTCTGTCTGTGTAGGGGAGCCAATGCACACGATCACTGGC
286 luPheSerSerGluMetAlaAspThrGlnThrProSerGlyIleCysValIleValProL

3361 TTCTTCCCGTCCTGATACATAGGCGTTTTCCACAATGCATTCATGAGCCACCACGAATAT
266 ysLysGlyAspGlnTyrMetProThrLysTrpLeuAlaAsnMetLeuTrpTrpSerTyrV

3421 AGTATTGCACTCAATATATGTTTCCCTAAACTCCAGCCTCATCAACAAGGATAATGTTG
246 alIleAlaThrLeuIleHisLysGlyLeuValGlyAlaGluAspValLeuIleIleAsnS

3481 CTTTTGACAAATGGAGGCATAGAGGAAATTAGGAAAGGTGCAAGGTTTACAAATTTGCGT
226 erLysValPheProProMetSerSerIleLeuPheProAlaLeuAsnValPheLysArgS

3541 GAAGTTTTCTGCTGGAGTGTTTGAAGGACAGACAAAGCTACCGGAGATGCCGTGCTATG
206 erThrLysGlnGlnLeuThrGlnLeuValSerLeuAlaValProSerAlaThrAspIleA

3601 GCGCGTGCAAGTAATGTCCTTTATCACGTCCCAATAATAATAAATGTCGGCCATTTGATGT
186 laArgAlaThrIleAspLysIleValAspTrpTyrTyrTyrIleAspAlaMetGlnHisG

3661 TCTGCCAACGAACGTTGTTCTGTGAGGTTTTTCAAACCTGAATCGTCCTAGCACAGCCTGT
166 luAlaLeuSerArgGlnGluHisProLysGluPheLysPheArgGlyLeuValAlaThrV

3721 ACGTTGTTTCCTTTGAAGCCAAAGTTTTGAAAAATAGTATGAATGGGACAAGAGGTGTAA
146 alAsnAsnGlyLysPheGlyPheAsnGlnPheIleThrHisIleProCysSerThrTyrS

3781 GAGGCAGATAGCTTATTGAAGATATTAAGAGCAGCTATGCGCGTTGAGCCAGTAACGATG
126 erAlaSerLeuLysAsnPheIleAsnLeuAlaAlaIleArgThrSerGlyThrValIleC

3841 CAATTCAATGTTTCATTAAAGAGTTTGAATGCAAGTACTTTTTCTGAGCCGGCGTTACCG
106 ysAsnLeuThrGluAsnLeuThrGlnIleCysThrSerLysGlySerGlyAlaAsnGlyT

3901 GTGATTAGATAAACATTAAATGGTAATCCGCCAGAGGCAAAGTGGTCGGTTCATCTAAA
86 hrIleLeuTyrValAsnPheProLeuGluAlaLeuProLeuThrThrProGluAspLeuA

3961 CGTGCCACAGTCTCAAACCAAGACAGTTGCGGCTTGGAGTCTTCATGAACAGCTTGTTCT
66 rgAlaValThrGluPheTrpSerLeuGlnProLysSerAspGluHisValAlaGlnGluS

4021 GATAGGATTGTAATGTCCGATAAAATCGCCTGAATGCTCTGCATTGCCGAAAAATTTAAG
46 erLeuIleThrIleAspSerLeuIleAlaGlnIleSerGlnMetAlaSerPheAsnLeuT

4081 TAAACAGGAGTGGTGATTTCTATTTCCCGCTGCTCTTCCCCGAAAAATGGACATGCCATT
26 yrValProThrThrIleGluIleGluArgArgSerLysGlySerPheProCysAlaMetL

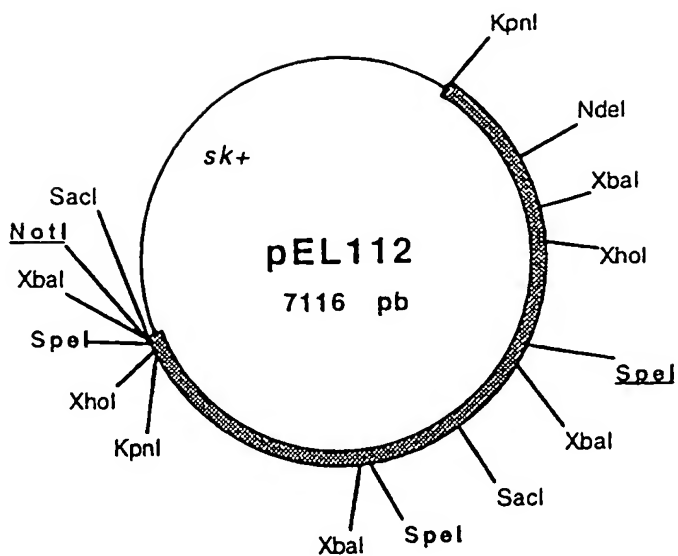
KpnI

COL D

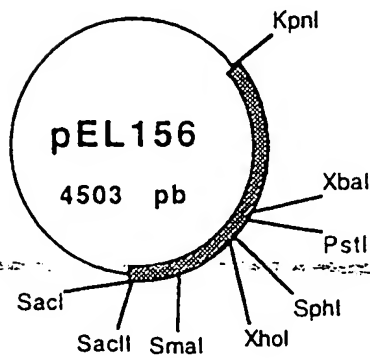
4141 TTCCCAATTGCGTCAGGTACC
6 ysGlyIleAlaAspProVal

Fig. 2

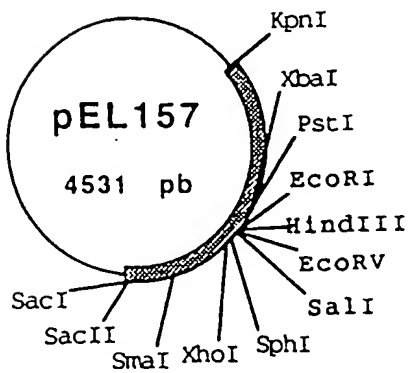
5/23



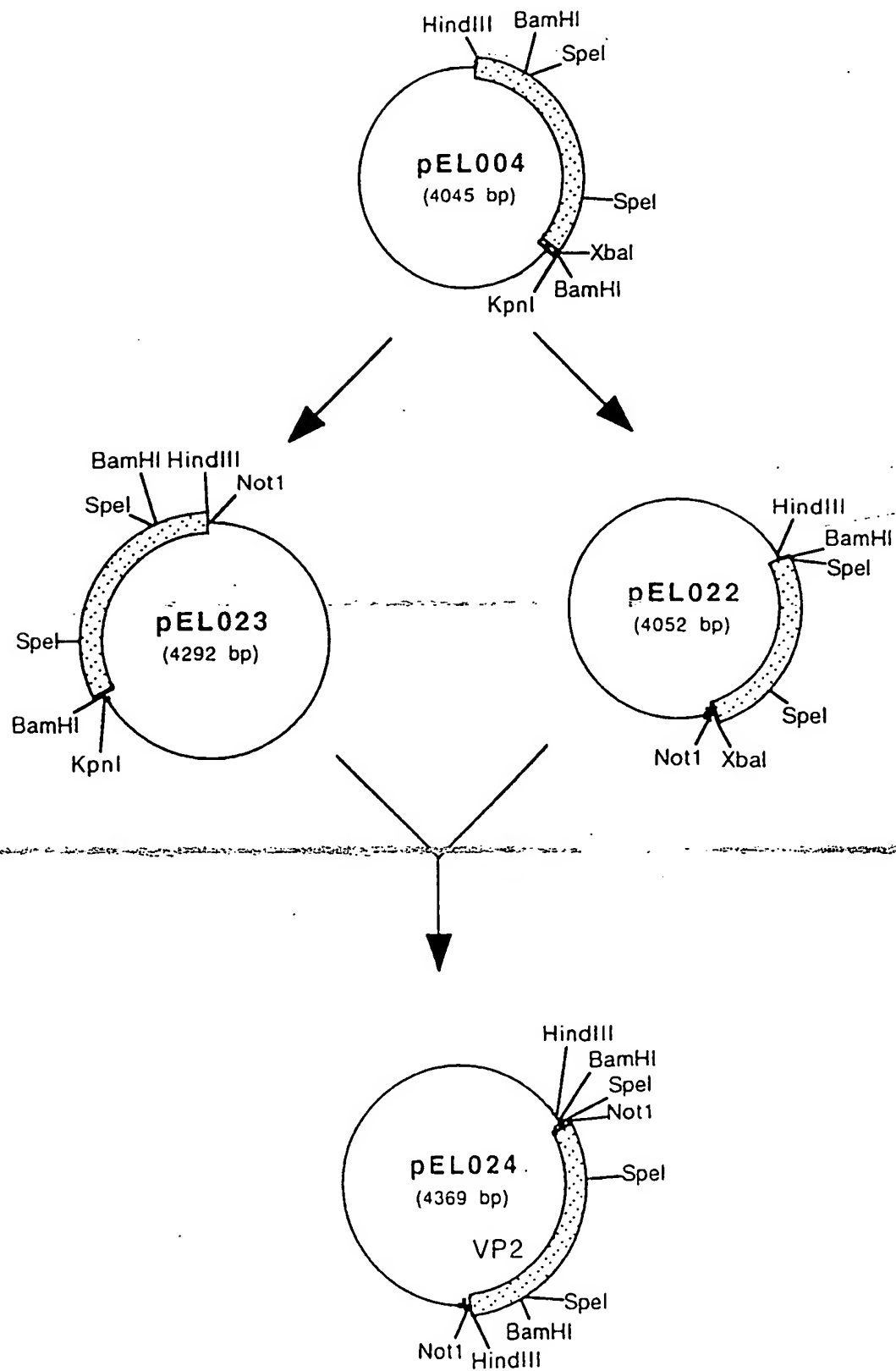
digestion NotI-SpeI
extrémités rendues "bouts francs"



digestion *XbaI*-*XhoI*
+ PCR EL001/EL002 *XbaI*-*EcoRI*
+ PCR EL003/EL004 *XhoI*-*EcoRI*



6/23

Fig. 4

7/23

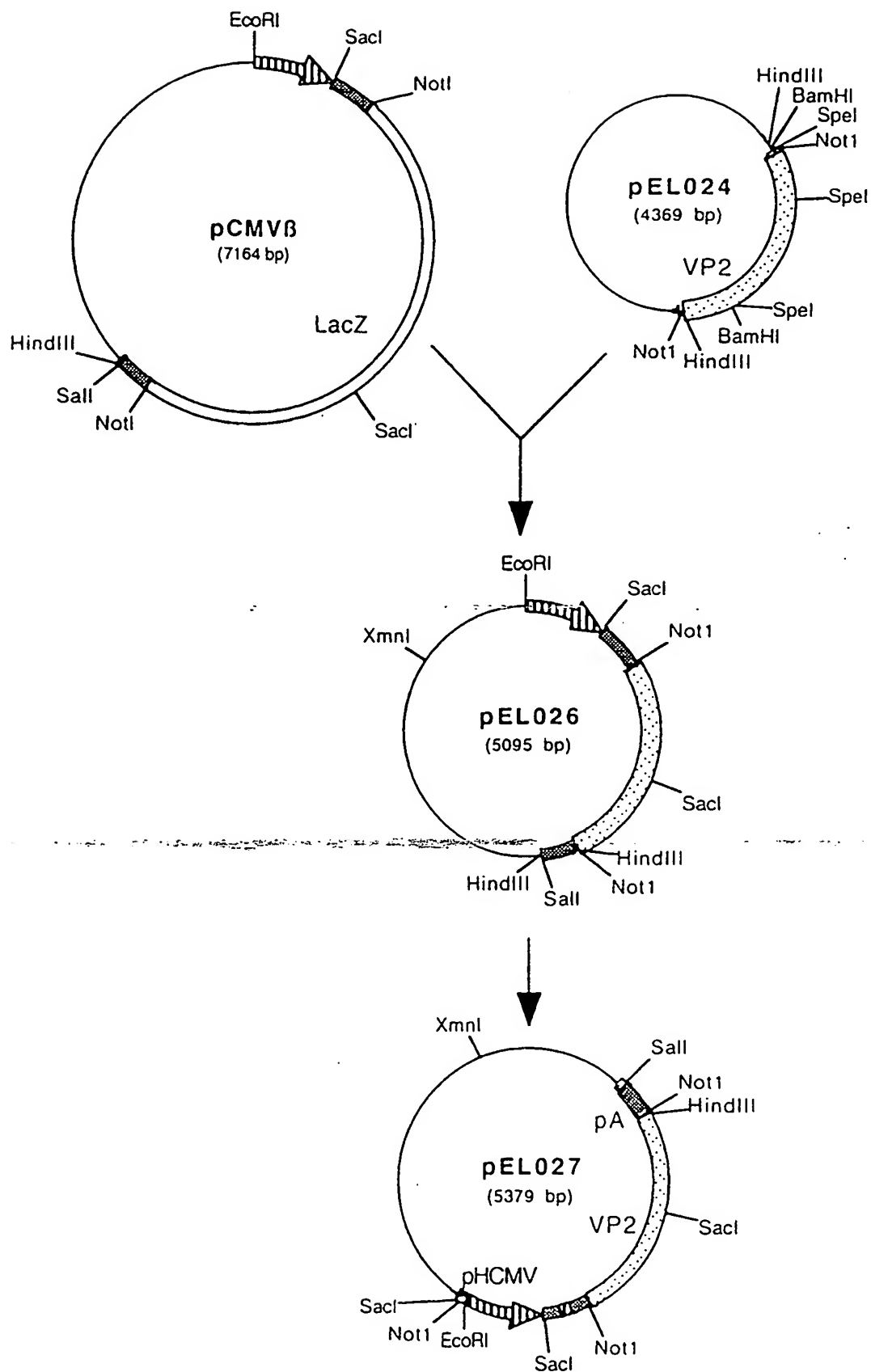
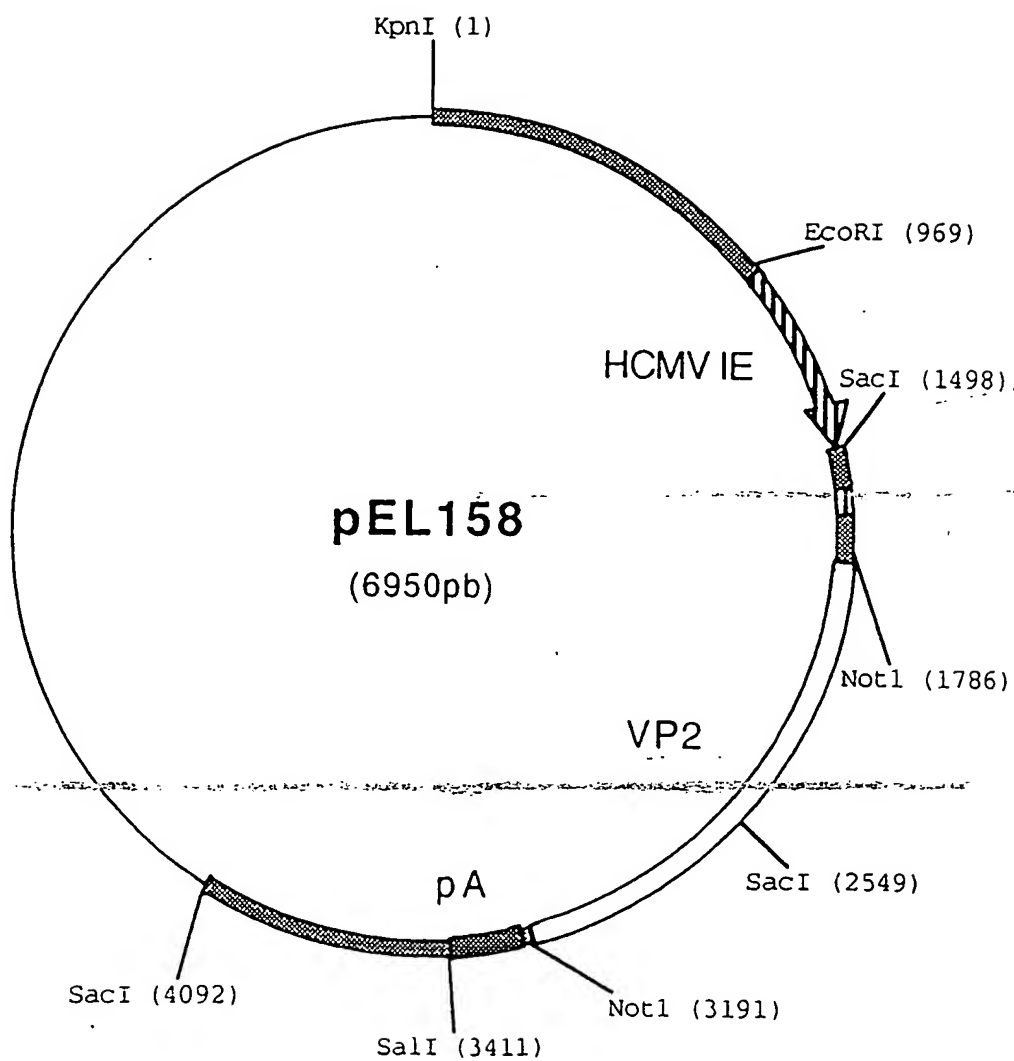


Fig. 5

8/23

Fig. 6

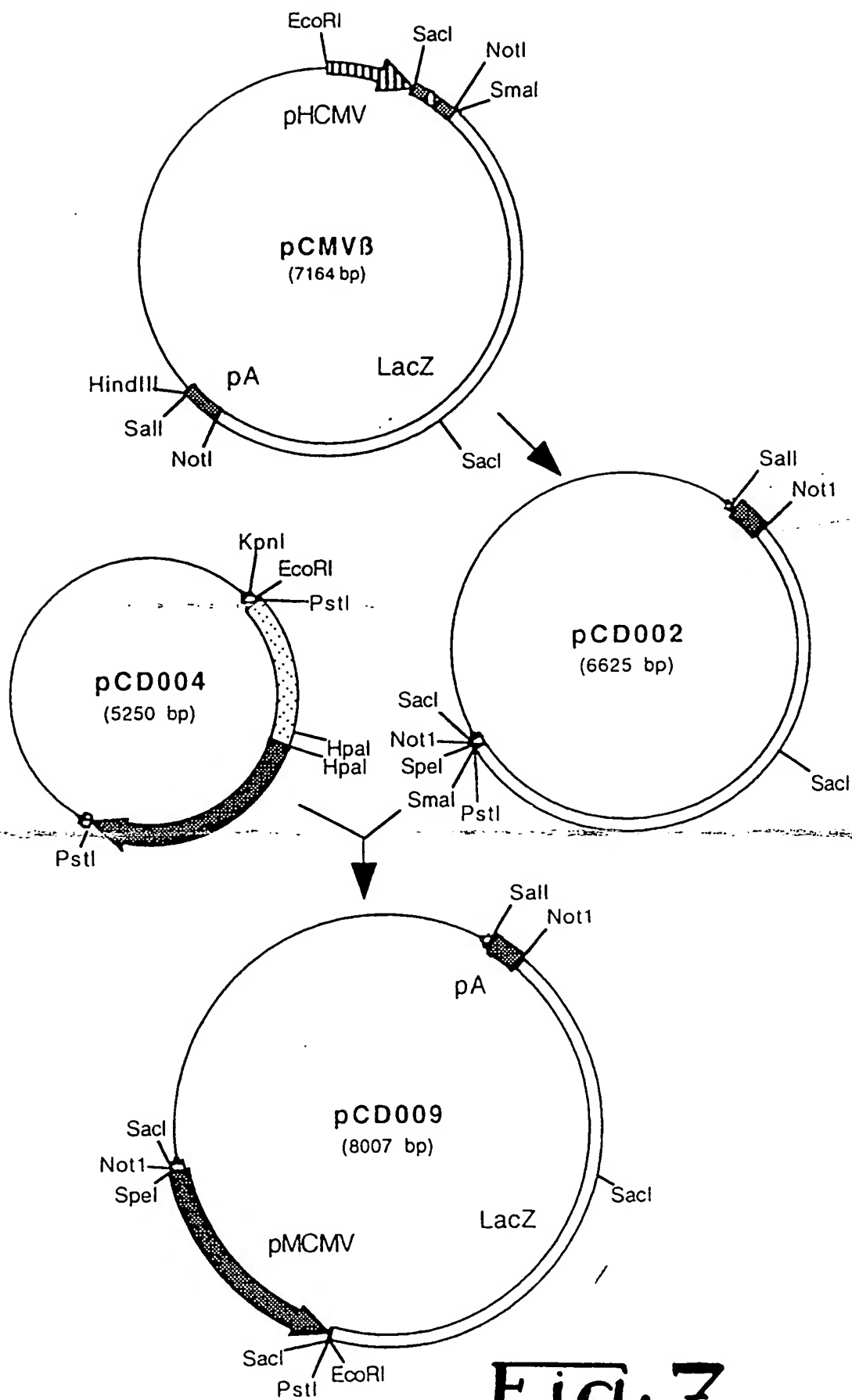
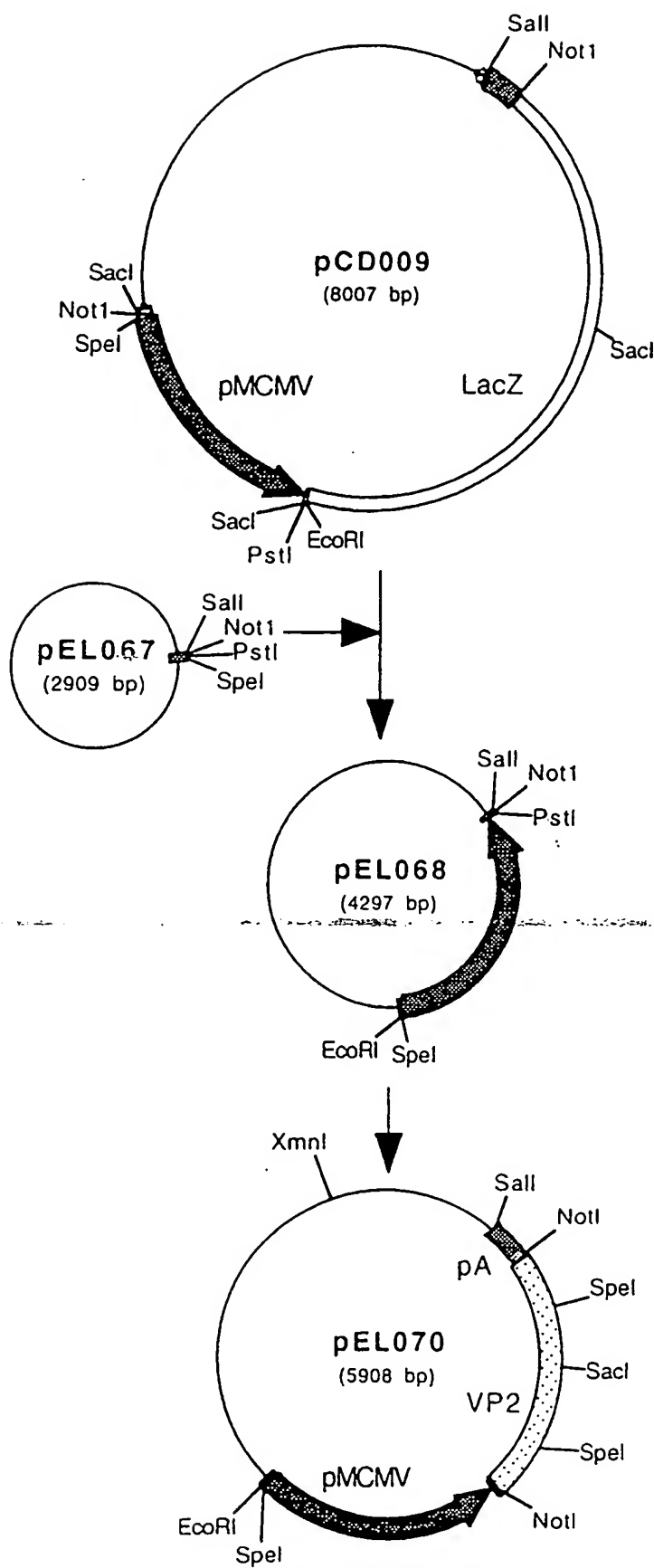
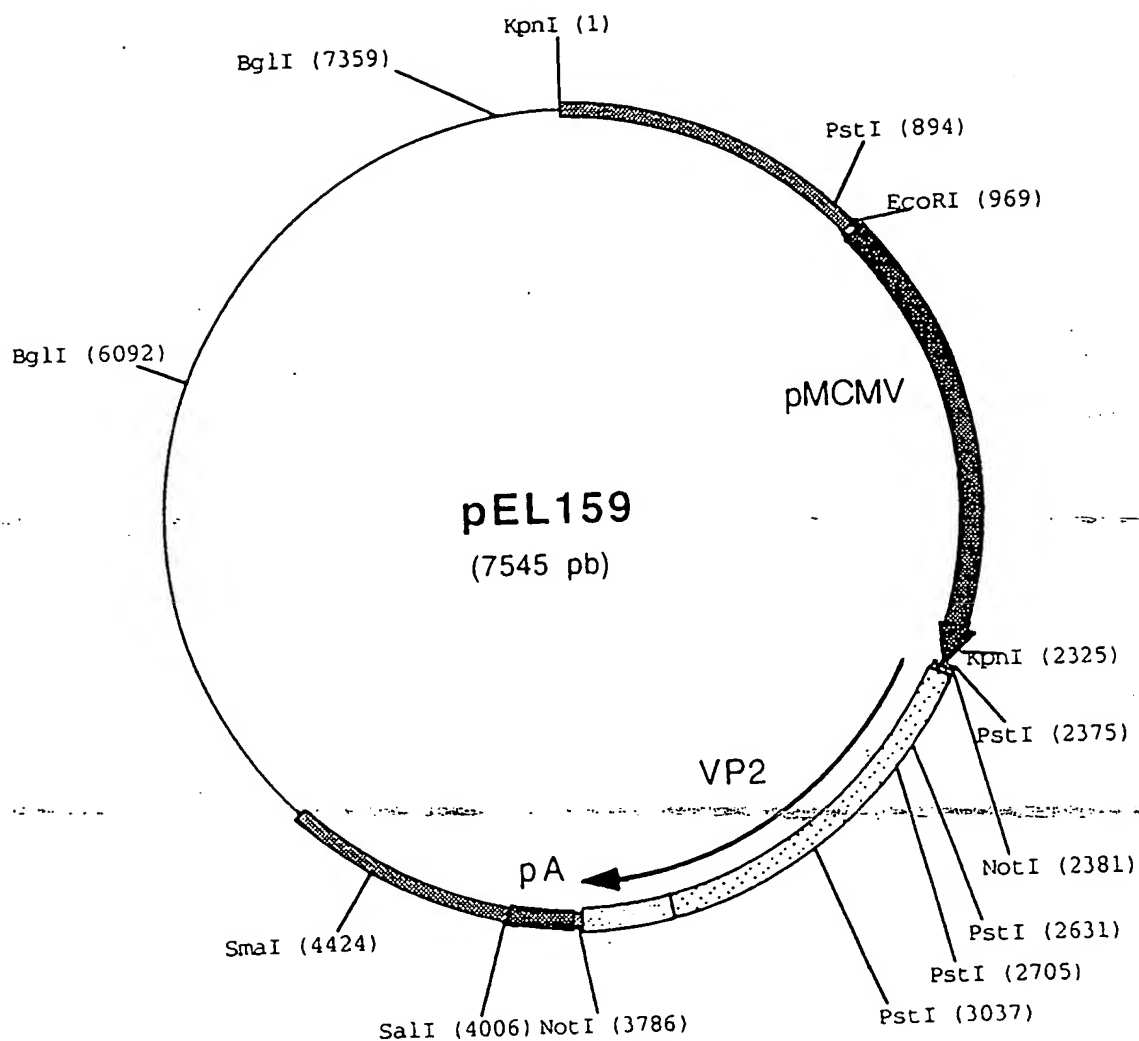


Fig. 7

10/23



11/23**Fig. 9**

12/23

1 TGCTACCTGATGTACAAGCAAAAGGCACAACAAAAGACCTTGTTATGGCTTGGGAATAAT
 61 ACCCTTGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATATGAATACAAACGAGAGCGGAGGTATC
 121 CCCAATAGCAATTTGCGTGTAATTTCTGGCAACCTGTTAATTAGAAGAATTAAGAAAAA
 181 CCACTGGATGTAAGTGACAAACAAGCAATACACGGGTAGAACGGTCGGAGAAGCCACCCC
 241 TCAATCGGGAATCAGGCCTCACACGTCCTTTCTACCGCATCATCAATAGCAGACTTCGG
 301 TCATGGACCGTGCAGTTAGCAGAGTTGCGCTAGAGAATGAAGAAAGAGAAGCAAAGAATA
 1 MetAspArgAlaValSerArgValAlaLeuGluAsnGluGluArgGluAlaLysAsnT
 361 CATGGCGCTTTGTATTCCGGATTGCAATCTTACTTTTAATAGTAACAACCTTAGCCATCT
 20 hrTrpArgPheValPheArgIleAlaIleLeuLeuLeuIleValThrThrLeuAlaIles
 421 CTGCAACCGCCCTGGTATATAGCATGGAGGCTAGCACGCCTGGCGACCTTGTGGCATAC
 40 erAlaThrAlaLeuValTyrSerMetGluAlaSerThrProGlyAspLeuValGlyIleP
 481 CGACTATGATCTCTAAGGCAGAAGAAAAGATTACATCTGCACTCAGTTCTAATCAAGATG
 60 roThrMetIleSerLysAlaGluGluLysIleThrSerAlaLeuSerSerAsnGlnAspV
 541 TAGTAGATAGGATATATAAGCAGGTGGCCCTTGAGTCTCCATTGGCGTTGCTAAACACTG
 80 alValAspArgIleTyrLysGlnValAlaLeuGluSerProLeuAlaLeuLeuAsnThrG
 601 AATCTGTAATTATGAATGCAATAACGTCTCTCTCTTATCAAATCAATGGAGCTGCAAATA
 100 luSerValIleMetAsnAlaIleThrSerLeuSerTyrGlnIleAsnGlyAlaAlaAsnA
 BspHI
 661 ATAGCGGGTGTGGGGCACCTGTTTCATGACCCAGATTATATCGGGGGGATAGGCAAAGAAC
 120 anSerGlyCysGlyAlaProValHisAspProAspTyrIleGlyGlyIleGlyLysGluL
 721 TTATTGTGGATGACGCTAGTGATGTACATCATTCTATCCCTCTGCGTTCCAAGAACACC
 140 euIleValAspAspAlaSerAspValThrSerPheTyrProSerAlaPheGlnGluHisL
 781 TGAACCTTTATCCCGGCACCTACTACAGGATCAGGTTGCACTCGGATACCCTCATTCGACA
 160 euAsnPheIleProAlaProThrThrGlySerGlyCysThrArgIleProSerPheAspI
 841 TAAGCGCTACCCACTACTGTTACACTCACAATGTGATATTATCTGGTTGCAGAGATCACT
 180 leSerAlaThrHisTyrCysTyrThrHisAsnValIleLeuSerGlyCysArgAspHisS
 901 CACACTCATATCAGTACTTAGCACTTGGCGTGCTTCGGACATCTGCAACAGGGAGGGTAT
 200 erHisSerTyrGlnTyrLeuAlaLeuGlyValLeuArgThrSerAlaThrGlyArgValP
 961 TCTTTTCTACTCTGCGTTCCATCAATTTGGATGACAGCCAAAATCGGAAGTCTTGCAGTG
 220 hrPheSerGlnThrLeuArgSerIleAsnLeuAspAspSerGlnAsnArgLysSerCysSerV
 1021 TGAGTGAACCTCCCTTAGGTTGTGATATGCTGTGCTCTAAAATCACAGAGACTGAGGAAG
 240 alSerAlaThrProLeuGlyCysAspMetLeuCysSerLysIleThrGluThrGluGluC
 Clal
 1081 AGGATTATAGTTCAATTACGCCTACATCGATGGTGCACGGAAGGTTAGGTTTACGGTC
 260 luAspTyrSerSerIleThrProThrSerMetValHisGlyArgLeuGlyPheAspGlyG
 1141 AATACCATGAGAAGGACTTAGACGTCATAACTTTATTTAAGGATTGGGTGGCAAATTACC
 280 lnTyrHisGluLysAspLeuAspValIleThrLeuPheLysAspTrpValAlaAsnTyrP
 1201 CAGGAGTGGGGGGTGGGTCTTTTATTAACAACCGCGTATGGTTCACGTTACGGAGGGC
 300 roGlyValGlyGlyGlySerPheIleAsnAsnArgValTrpPheProValTyrGlyGlyL
 1261 TAAAACCCAATTTCGCCTAGTGACACCGCACAAGAAGGGAGATATGTAATATACAAGCGCT
 320 euLysProAsnSerProSerAspThrAlaGlnGluGlyArgTyrValIleTyrLysArgT
 1321 ACAATGACACATGCCCAGATGAACAAGATTACCAGATTCCGGATGGCTAAGTCTTCATATA
 340 yrAsnAspThrCysProAspGluGlnAspTyrGlnIleArgMetAlaLysSerSerTyrL
 1381 AGCCTGGGCGGTTTGGTGGAAAACGCGTACAGCAGGCCATCTTATCTATCAAGGTGTCAA
 360 ysProGlyArgPheGlyGlyLysArgValGlnGlnAlaIleLeuSerIleLysValSerT
 1441 CATCTTTGGGCGAGGACCCGGTGCTGACTGTACCGCTAATACAATCACACTCATGGGG
 380 hrSerLeuGlyGluAspProValLeuThrValProProAsnThrIleThrLeuMetGlyA
 1501 CCGAACGGAGAGTTCTCACAGTAGGGACATCTCATTCTTGTACCAGCGAGGGTCTTCAT
 400 laGluArgArgValLeuThrValGlyThrSerHisPheLeuTyrGlnArgGlySerSerT

Fig. 10

13/23

1561 ACTTCTCTCCTGCTTTATTATACCTATGACAGTCAACAACAAAACGGCTACTCTTCATA
420 ▶ yrPheSerProAlaLeuLeuTyrProMetThrValAsnAsnLysThrAlaThrLeuHis
1621 GTCCTTACACATTCAATGCTTTCAGTCCCTTGTCAGGCATCAGCAA
440 ▶ erProTyrThrPheAsnAlaPheThrArgProGlySerValProCysGlnAlaSerAlaA
1681 GATGCCCAACTCATGTGTCACTGGAGTTTATACTGATCCGTATCCCTTAGTCTTCCATA
460 ▶ rgCysProAsnSerCysValThrGlyValTyrThrAspProTyrProLeuValPheHisA
1741 GGAACCATACCTTGCGGGGGGTATTCGGGACAATGCTTGATGATGAACAAGCAAGACTTA
480 ▶ rgAsnHisThrLeuArgGlyValPheGlyThrMetLeuAspAspGluGlnAlaArgLeuA

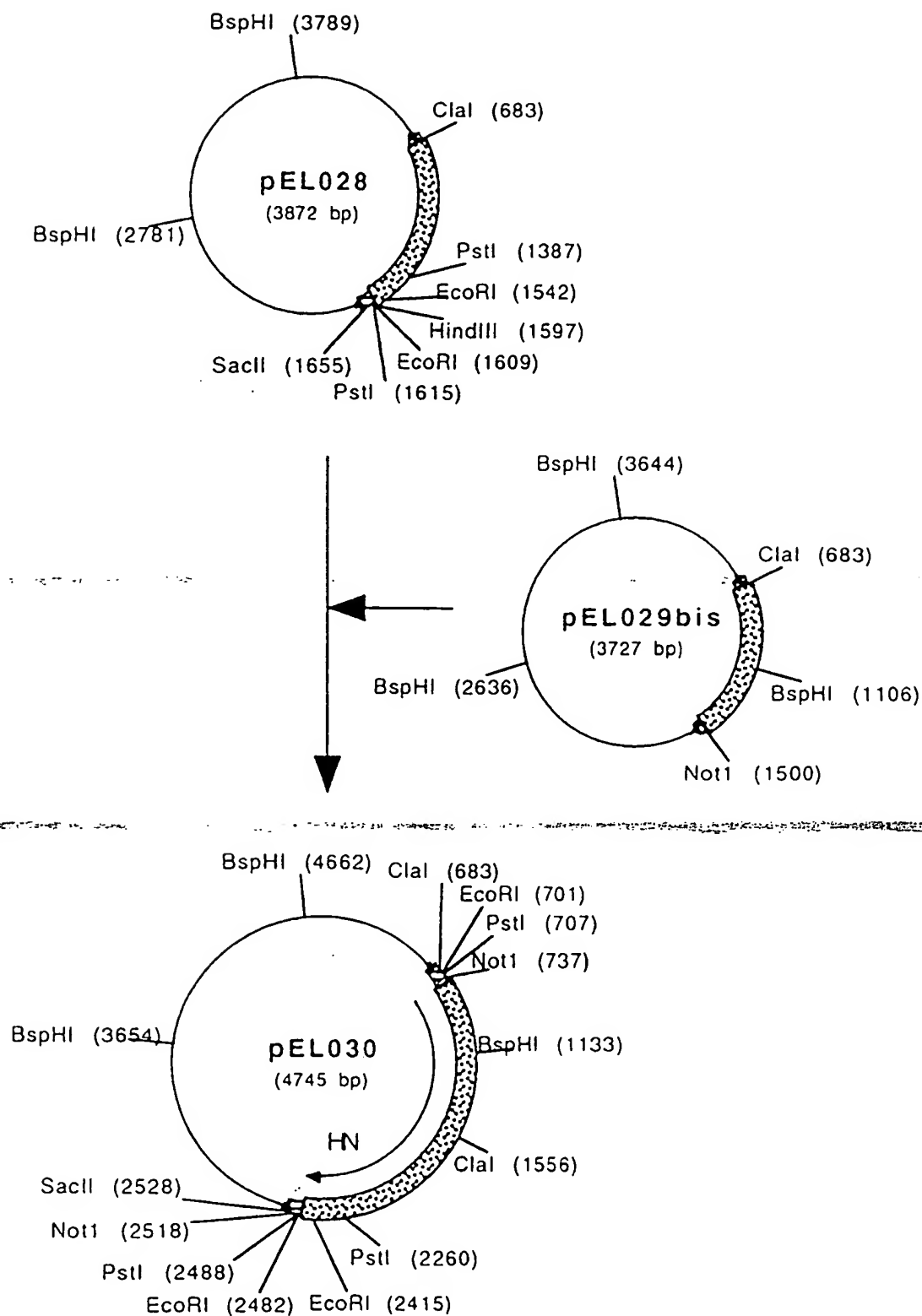
PstI

1801 ACCCTGTATCTGCAGTATTTGATAACATATCCCGCAGTCGCATAACCCGGGTAAGTTCAA
500 ▶ snProValSerAlaValPheAspAsnIleSerArgSerArgIleThrArgValSerSers
1861 GCCGTACTAAGGCAGCATAACGACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAAGACCAATAAAA
520 ▶ erArgThrLysAlaAlaTyrThrThrSerThrCysPheLysValValLysThrAsnLysT
1921 CATATTGCCTCAGCATTGCAGAAATATCCAATACCCTCTTCGGGGAATTCAGGATCGTTC
540 ▶ hrTyrCysLeuSerIleAlaGluIleSerAsnThrLeuPheGlyGluPheArgIleValP
1981 CTTTACTAGTTGAGATTCTCAAGGATGATGGGATTTAAGAAGCCAGGTCTGGCCAGTTGA
560 ▶ roLeuLeuValGluIleLeuLysAsp

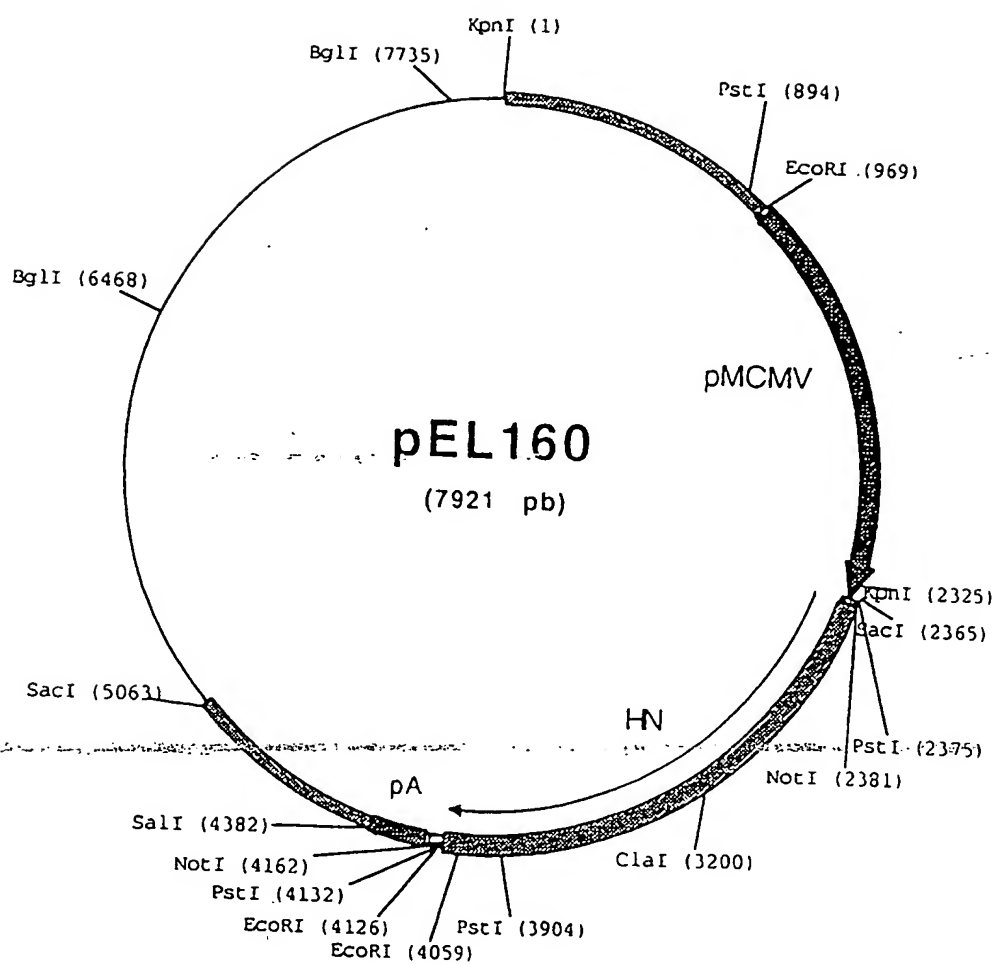
2041 GTCAACTGCGAGAGGGTCGGAAAGATGACATTGTGTACCTTTTTTTTGTAAATGCCAAGG
2101 ATCAAAGTGGATACCGGCGGAGCGCGAATCTATGCTGCGAGTACGCCATAATCAGATA
2161 GTACTAATATGATTAGTCTTAATCTTGTCGATAGTAACTTGGTTAAGAAAAAATATGAGT
2221 GGTAGTGAGATACACAGCTAAACAACACGAGAGATAGCACGGGTAGGACATGGCGAGC
2281 TCCGGTCCCCGAAAGGGCAGAGCATCAGATTATCCTACCAGAGTCACATCTGTCTCACC
2341 TTGGTCAAGCACAACTGCTCTATTACTGGAAATTAAGTGGCGTACCGCTTCCTGACGAA
2401 TGTGACTTCGACCACCTCATTATCAGCCGACAATGGAAGAAAATACTTGAATCGGCCACT
2461 CCTGACACTGAGAGGATGATAAAGCTCGGGCGGGCAGTACACCAGACTCTCGACCACCGC
2521 C

Fig. 10

14/23

Fig. 11

15/23

**Fig. 12**

16/23

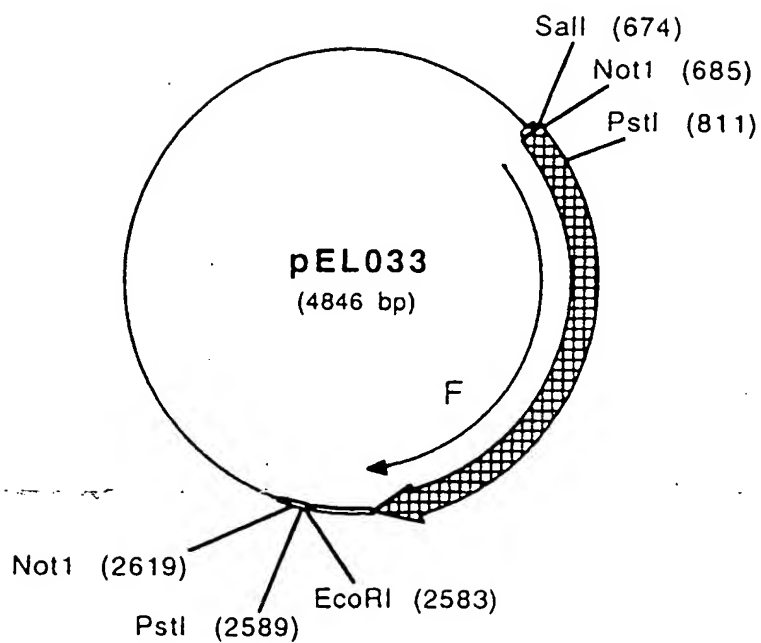
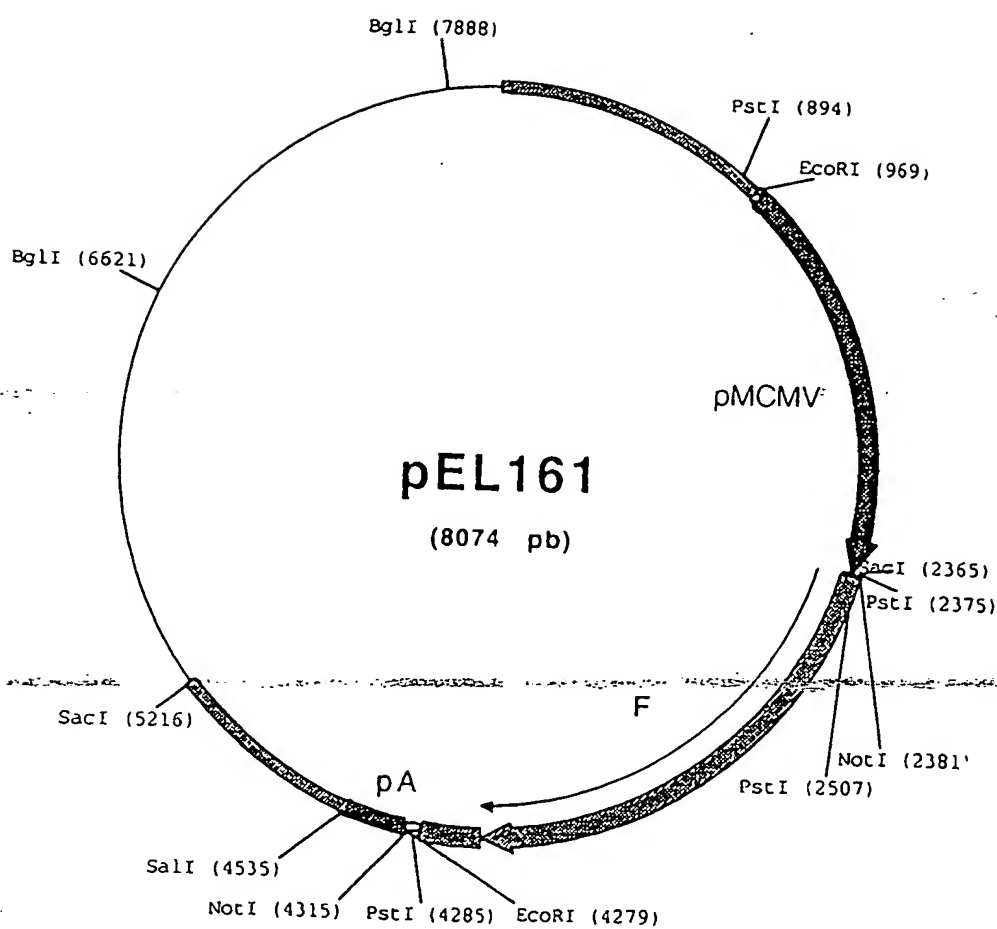


Fig. 13

17/23

Fig. 14

18/23

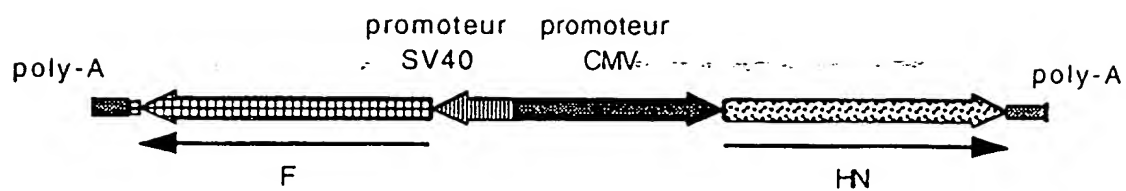
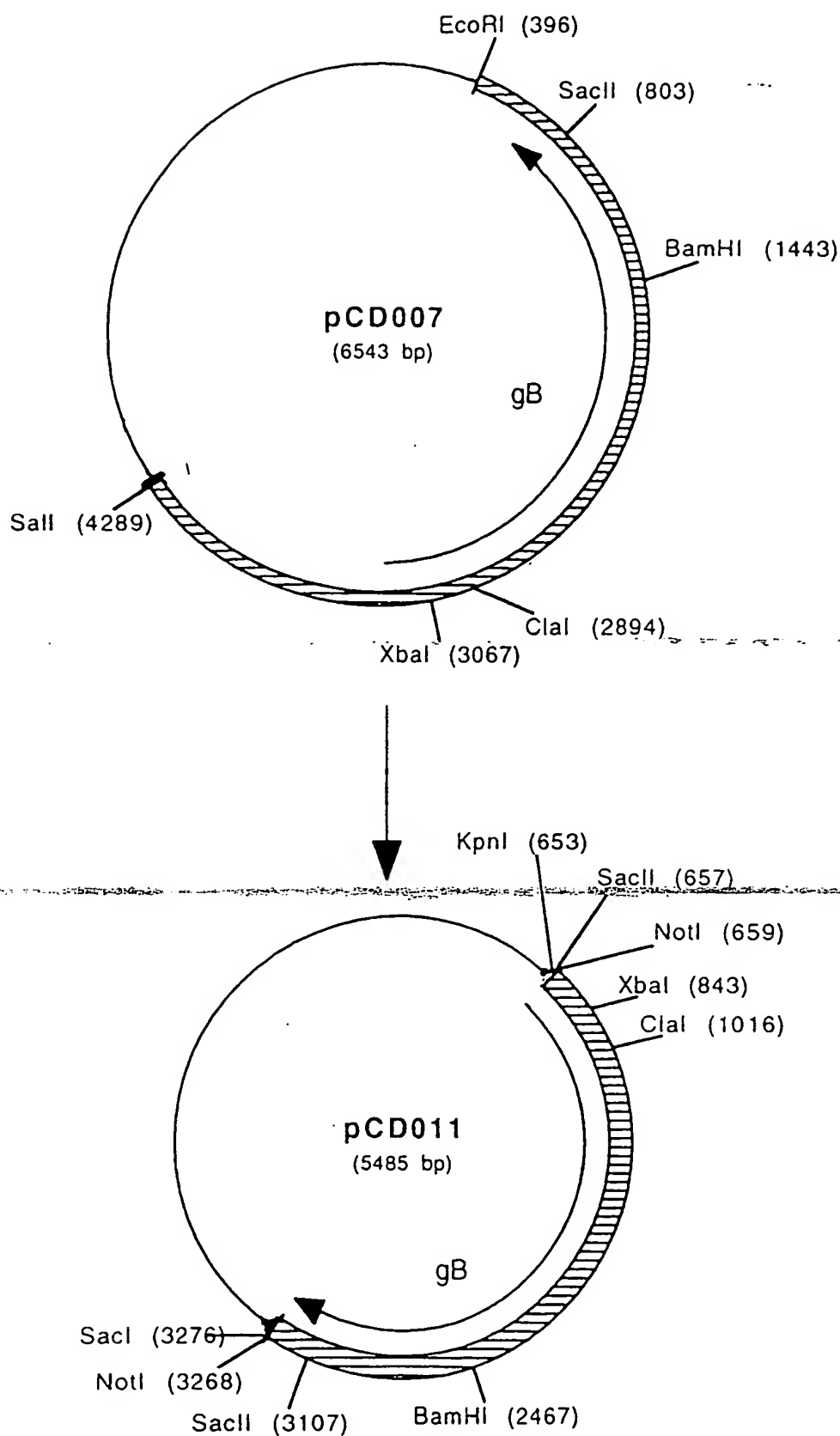


Fig.15

19/23

**Fig. 16**

20/23

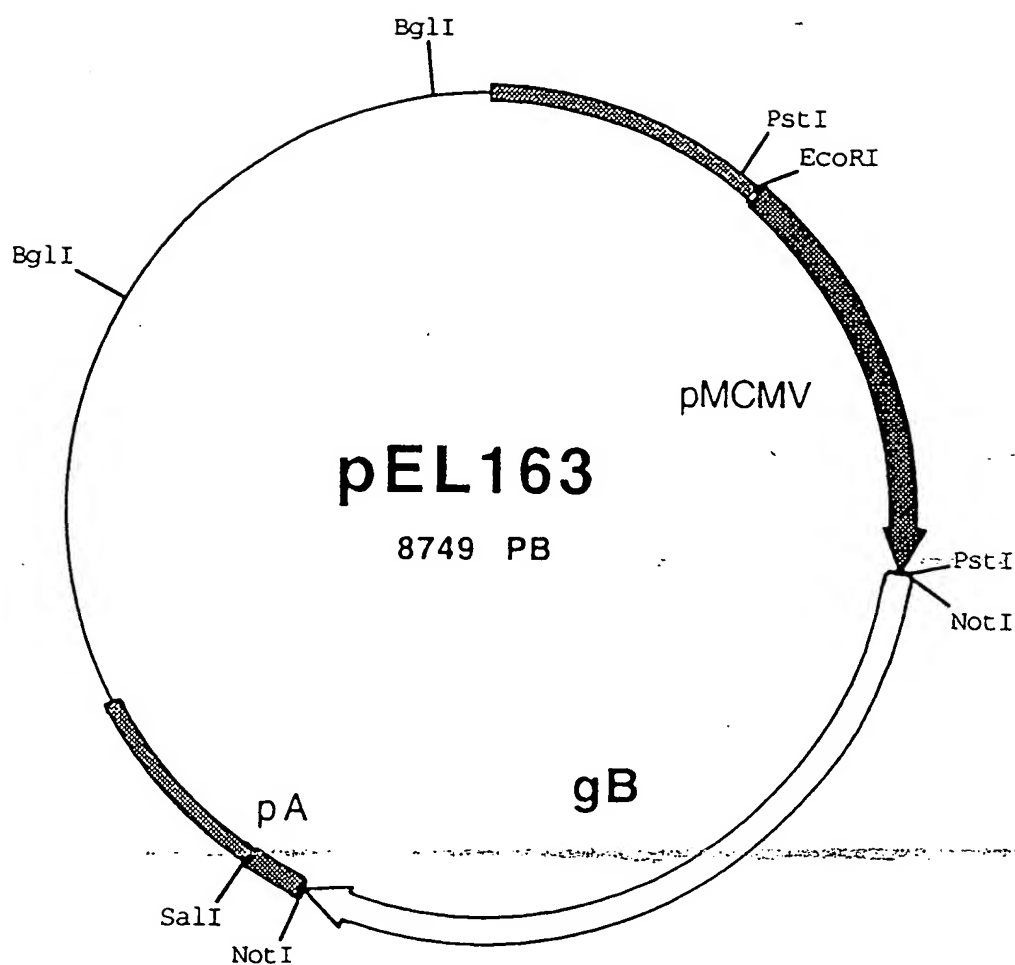


Fig. 17

21/23

UL3

1 GGTACCGAGATCCCCTCTGTGACAGAAGTTCTATATGGAGCCTCGTCTATTGACTGTGTT
 1► GlyThrGluIleProSerValThrGluValLeuTyrGlyAlaSerSerIleAspCysVal
 61 TCCGATCGTACGAATGTCATGATACGCATTCTCATGTTACTCCGGACCACGCAAAAGAC
 21► SerGlySerTyrGluCysHisAspThrHisSerHisValThrProAspHisAlaLysAsp
 121 GTAGCCGTCCAAGGGCATGTCAAAACGAATAACACCGAAGATGTAGAATCTTTGGACTCG
 41► ValAlaValGlnGlyHisValLysThrAsnAsnThrGluAspValGluSerLeuAspSer
 181 TGTGGCTTTGACAGTGTTCATGATATTTTCATTTCGGGGAACCTCGGAGAAGACAGCTT
 61► CysGlyPheAspSerValPheMetIlePheSerPheGlyGluLeuGlyArgArgGlnLeu
 241 ACCGATAACATTTCGAAAAGACATTTGTACTTCCCTAGACAGAGTTCCGATGGCATGTACT
 81► ThrAspAsnIleArgLysAspIleCysThrSerLeuAspArgValProMetAlaCysThr
 301 AAGACGTCCGCATTTGCAGGTGCAAATAGACATCAGAAAAGTTTGCAGATGTTTCTCTTT
 101► LysThrSerAlaPheAlaGlyAlaAsnArgHisGlnLysSerLeuGlnMetPheLeuPhe
 361 TGCAAGAGAAGACATGCCCCGCAAATAAGGGCTCGCCTAAAAGACATTATTTCTGTCAGA
 121► CysLysArgArgHisAlaProGlnIleArgAlaArgLeuLysAspIleIleSerSerArg
 421 AAGTCAAGAAAATATTTTACGCAGTCCGAGGATGGAGAACTCACCCCGGTGTGCCAGTT
 141► LysSerArgLysTyrPheThrGlnSerGluAspGlyGluThrHisProGlyValProVal
 481 TTCTTTCACGAGTTTGTAGCCCATGCCCCGGTATTTATTCCACGCGACAATCTTGCCCAT
 161► PhePheHisGluPheValAlaHisAlaProValPheIleProArgAspAsnLeuAlaHis
 541 GCCTGTTCGAGATTGGCCAGGCATATGACTGGAGGAATGGCGTGTGACTTACGTGGGCG
 181► AlaCysArgArgLeuAlaArgHisMetThrGlyGlyMetAlaCys...
 601 CGCCTCTGGGTGGAACCCAGCGCTAGAACATTTATACCTGCCCATTTGCGAAAGTTACTC

UL3.5

661 AGAACGCGAATATTGCACTTCCTGGACTATGAAGTACGGTCAGGCTGCTATTGCAACTGA
 1► MetLysTyrGlyGlnAlaAlaIleAlaThrAs
 721 TATGGACTTTGCCCCGATGTCTCGCCAGCCTCCACGGAAGAACTCCAGGTGCTCTTCGGC
 11► pMetAspPheAlaArgMetSerArgGlnProProArgLysAsnSerArgCysSerSerAl
 781 ACGGACGGCTGCGTTACAGGTAATGGATATTGCTTTCTACCGAAGTCGGAAAAGTTGCC
 341 aArgThrAlaAlaLeuGlnGlyAsnGlyTyrCysPheLeuProLysSerGluLysLeuP
 841 TGAGCTACCCTCTAGACATTTTCGAGACCCGATTTTCTCACTACTACCTCCAGCTGCAGC
 51► oGluLeuProSerArgHisPheGluThrArgPheSerSerLeuLeuProProAlaAlaAl
 901 TAAGTGACAGCAACTATGAAGTCAACTCATTTCGCAATGCGACGCAATAATTAAATGC
 71► aLys...
 961 TCGTATTTTCATAATTGGTGTATTACTTTTATTATTTCCTCTAACAGTCCGGCATGCC
 179► ...GluGluLeuLeuGlyAlaHisAr
 1021 TTGCCGCAAACCTCTACAAGATCTCGAGGAACGCTTTCTCTCGGACACTCCAGCGATTCTG
 170► gAlaAlaPheGluValLeuAspArgProValSerGluGluProCysGluLeuSerGluPr
 1081 GAGAGGATTGGGAACATGTGGGGTGGTGTGCGCGCTAGATGCTAGATCTTCCGGGGTTT
 150► oSerSerGlnSerCysThrProThrThrHisAlaSerSerAlaLeuAspGluProThrGl
 1141 CGTATATGGTTACAGTTAAGTGAGCGACGCCCCAAAAAATTCATCATGTTGATGTTGCCGC
 130► uTyrIleThrValThrLeuHisAlaValGlyLeuPheAsnMetMetThrIleAsnGlySe
 1201 TGCTCCACCGTTCTCGCGTTCTCCGCGCCCTAGAAACCAACATGCCGAGAAGTGAAG
 110► rSerTrpArgGluArgThrGlyGlyArgGlyLeuPheTrpCysAlaSerPheGlnPheAl
 1261 CTAATGTTTCTCTGAGGGTCTCGGTGAGAACCATTGCGCTCCAAACAGTATGCGCAAA
 90► aLeuThrGluGlySerProGlyArgHisSerGlyAsnArgGluLeuCysTyrAlaCysPh
 1321 ATTCTTCTTCACAGTCTACAGCGATCATGTTGCGACGGGATTGTGAATTACTATTACTT
 70► eGluGluGluCysAspValAlaIleMetThrAlaValProAsnHisIleValIleValLy

22 / 23

1381 TCCCCGGTGGTAATTGGTGGCGATACATTTTATTTCCGATGCAAATAAACCGCATTCCTC
50 sGlyProProLeuGlnHisArgTyrMetLysAsnGlyIleCysIlePheArgMetGlyGly
1441 CATCGCATGAGTATACTACTTGTTCGTATTCCGTGGCCGAGCCATGCCCCAAGCCTTGGAA
30 yAspCysSerTyrValValGlnGluTyrGluThrAlaSerGlyHisGlyLeuGlyGlnVal

UL4

1501 CTCCTACCATTACGTAGCTTATGAAAATCATGTTCTCGGGACGAGGAGGGTATGCAACAC
10 lGlyValMetValTyrSerIlePheIleMet

1561 TCCAAACGACGGTGGGAAACTGATTTTAAAGCCACGCGTGTGGCTACTTTTGAGGATTAG
841 . . . T

1621 TATACTAGTCGCGTTTCTTTGCATCTGAGCGCGCGAAGAATGTGTTGGCTTACTTGTCTGA
839 yrValLeuArgThrGluLysCysArgLeuAlaArgLeuIleHisGlnSerValGlnArgT

1681 GTATCTTCGTATTTTCGTTCGCAGGGGTTTAAGTTCATGCGCAAATATTCGCTACTCGTTT
819 hrAspGluTyrLysThrArgLeuProAsnLeuAsnMetArgLeuTyrGluSerSerThrV

1741 ACTCTAGACATTGCTACGTATGCAGTATTTAATTTTCATTGTTCCGTGAGAAAAACATATT
799 alArgSerMetAlaValTyrAlaThrAsnLeuLysMetThrGlyHisSerPheCysIleA

1801 GCTACCCTGTCTAAACTTAACCCCTTGAGATCGTGTGATCGTCATTGCAAGGCTCGAACTT
779 laValArgAspLeuSerLeuGlyGlnSerArgThrIleThrMetAlaLeuSerSerSerI

1861 ATTCCGTGGTCAATTGTTATGGCCATCCTTAATTCCTGTCCACCTATATTATCGACAAAA
759 leGlyHisAspIleThrIleAlaMetArgLeuGluGlnGlyGlyIleAsnAspValPheT

1921 GTTGCTTTGTTATGGCACAGGACTGAAACGAACCCCATTTGATCCCTTACGACAAGTCTT
739 hrAlaLysAsnHisCysLeuValSerValPheGlyMetGlnAspArgValValLeuArgP

1981 GGCAAGTCTAGCATTTGTAAAATTGGCTCGGCCCCATTCGTGGGCTTTTGAGGTGTCTCTCA
719 roLeuAspLeuMetGlnLeuIleProGluAlaTrpGluHisAlaLysSerThrAspGluA

2041 GCATATCCCGGAAATCTTGCTCGCGTAATCCCGCGTAAGGTATATGTGTCGGTTTGAGCA
699 laTyrGlyProPheArgAlaArgThrIleGlyArgLeuThrTyrThrAspThrGlnAlaA

2101 GCAAATGCACATACTGCTCCCTTGAAACTGGAGATAGAAATTTCTTGACTTGAGAAAGAA
679 laPheAlaCysValAlaGlyLysPheSerSerIleSerIleGluGlnSerSerPheSerA

2161 GCCGTTCGACGAATGAGCTAAACGGCGCGGCAGTAAATACACTCCCAAAGAGCTCACAC
659 laThrGlyValPheSerSerPheProAlaAlaThrPheValSerGlyPheLeuGluCysL

2221 AGCACCGCGTAACGTAAAGTATAAATTCCTTTTCATCTGCTCGAAATAACTAAATATTTCT
639 euValAlaTyrArgLeuThrTyrIleArgLysMetGlnGluPheTyrSerPheIleGluG

2281 TGACCGTGGACATCGCTCCCGCAAATCTCATAATTTAGATAGAATTGATCTAACGACTTA
619 lnGlyHisValAspSerGlyCysIleGluTyrAsnLeuTyrPheGlnAspLeuSerLysA

2341 TCAAAAATATCGAATAAATCATCTTTGTCAATTCACATCGGCATTTCGGACATTCATCTTCG
599 spPheIleAspPheLeuAspAspLysAspAsnValAspAlaAsnProCysGluAspGluA

2401 TTAAAACAAAATTTTTCACCATTTCCCATGTCAAAGTTCTGAGTTTCTCGCTCCGGCATT
579 snPheCysPheLysGluGlyAsnGlyMetAspPheAsnGlnThrGluProGluProMetA

2461 GCTAGGGAGTACAACCTGTCATACGCCATTGTTAATTTATCTTCGGGGAGGCCCTCTGTT
559 laLeuSerTyrLeuArgAspTyrAlaMetThrLeuLysAspGluProLeuGlyGluThrA

2521 CGGAGAAATTCGTAAAATTTAATCATCCCATAGTATAGCAAGGTCGACAGAAAGTGATAG
539 rgLeuPheGluTyrPheLysIleMetGlyTyrTyrLeuLeuThrSerLeuPheHisTyrA

2581 GCAAATTCCTACTTTGTCTTCTCCATACGCTTTGAGAAAGCTATCTTCGGATAATACATGT
519 laPheGluValLysAspGluGlyTyrThrLysLeuPheSerAspGluSerLeuValHisA

2641 GCGAATTTTTCAAATGTTCCCTCAAACCGAAGATCAATTTTTCACCTTTTGTGTTACC
499 laPheLysGluPheThrGlyGluPheGlyPheIleLeuLysLysValLysLysThrValT

2701 GTGATCTGGCTATTGAGTACGTGCGAGGCATCAGTCGTTACTACTGTATATTCATTACTC
479 hrIleGlnSerAsnLeuValHisSerAlaAspThrThrValLeuThrTyrGluAsnSerG

23/23

2761 TCATCTCGATGGTATTCAAATCTGGGCGCGGTCACATCTAGATCCCTGCTCTGTGAATAG
459 luAspArgHisTyrGluPheArgProAlaThrValAspLeuAspArgSerGlnSerTyrA
2821 TTTCCAAGGCGAGAGGAATTGTTTTGCAGCCAGCGATCAATATTTAGTGTCTCTTGACCC
439 snGlyLeuArgSerSerAsnAsnGlnLeuTrpArgAspIleAsnLeuThrGluGlnGlyT
2881 GTCAGGGATTATATACTTTTCAAATGCCGCCATATCTACTATTGTATACATCGGCAGGAGA
419 hrLeuSerLysTyrLysGluPheAlaAlaMetAspValIleThrTyrMetProLeuLeuP
2941 AATACCCTATATTTTTCAGATTCTGTGCACGAAGCTTTGCGTGCAATTTAGAAACGTAT
399 heValArgTyrLysGluSerLysGlnAlaArgLeuLysAlaHisLeuLysSerValTyrG
3001 TCTTTAACTTCTTCGTGGGACGAGAAAAGCCTAGTCCATCCAGGAAGCTTTGATGGATCT
379 luLysValGluGluHisSerSerPheLeuArgThrTrpGlyProLeuLysSerProAspL
3061 TTGATGAATGATTCTGATACAATGAAGTATCTAAGAATCTGGCATGGCGTTCTGTCAAA
359 ysIlePheSerGluSerValIlePheGlnAspLeuPheArgAlaHisArgGluThrLeuP
3121 GGTAACCCAAATTCAAATGCCTTTAATACTTCTCCGAAAGCAGGCTCCGAGCATCGTTTA
339 roLeuGlyPheGluPheAlaLysLeuValGluGlyPheAlaProGluSerCysArgLysA
3181 TTATTAATAAAGATGGCCCACTGCTTCTTGATATTCAGGACTGAAAACAGTGTAGGAGTA
319 snAsnIlePheIleAlaTrpGlnLysLysIleAsnLeuValSerPheLeuThrProThrC
3241 CAAATAAGATTACTTAAATGTTTATGCTGCTGGATATAAGGTGTCGTTGATTTCTGTGC
299 ysIleLeuAsnSerLeuIleAsnIleSerSerSerIleLeuHisArgGlnAsnArgHisG
3301 TCGAAGCTGCTTTCCATTGCGTCTGTCTGTGTAGGGGAGCCAATGCACACGATCACTGGC
279 luPheSerSerGluMetAlaAspThrGlnThrProSerGlyIleCysValIleValProL
3361 TTCTTCCCGTCCTGATACATAGGCGTTTCCACAATGCATTTCATGAGCCACCACGAATAT
259 ysLysGlyAspGlnTyrMetProThrLysTrpLeuAlaAsnMetLeuTrpTrpSerTyrV
3421 ACTATTGCAGTCAATATATGTTTCCCTAAACTCCAGCCTCATCAACAAGGATAATGTTG
239 alIleAlaThrLeuIleHisLysGlyLeuValGlyAlaGluAspValLeuIleIleAsnS
3481 CTTTGTGACAAATGGAGGCATAGAGGAAATTAGGAAAGGTGCAAGGTTTACAAATTTGCGT
219 erLysValPheProProMetSerSerIleLeuPheProAlaLeuAsnValPheLysArgS
3541 GAAGTTTTCTGCTGGAGTGTTTGAAGGACAGACAAAGCTACCGGAGATGCCGTGTCTATG
199 erThrLysGlnGlnLeuThrGlnLeuValSerLeuAlaValProSerAlaThrAspIleA
3601 GCGCGTGCAAGTAATGTCTTTATCACGTCCCAATAATAATAAATGTGGCCATTTGATGT
179 laArgAlaThrIleAspLysIleValAspTrpTyrTyrTyrIleAspAlaMetGlnHisG
3661 TCTGCCAACGAACGTGTTTCGTGAGGTTTTTCAAACCTGAATCGTCTTAGCACAGCCTGT
159 luAlaLeuSerArgGlnGluHisProLysGluPheLysPheArgGlyLeuValAlaGlnV
3721 ACGTTGTTTCTTTGAAGCCAAAGTTTTGAAAAATAGTATGAATGGGACAAGAGGTGTAA
139 alAsnAsnGlyLysPheGlyPheAsnGlnPheIleThrHisIleProCysSerThrTyrS
3781 GAGGCAGATAGCTTATTGAAGATATTAAGAGCAGCTATGCGCGTTGAGCCAGTAACGATG
119 erAlaSerLeuLysAsnPheIleAsnLeuAlaAlaIleArgThrSerGlyThrValIleC
3841 CAATTCAATGTTTTCATTAAAGAGTTTGAATGCAAGTACTTTTTCTGAGCCGGCGTTACCG
99 ysAsnLeuThrGluAsnLeuThrGlnIleCysThrSerLysGlySerGlyAlaAsnGlyT
3901 GTGATTAGATAAACATTAAATGGTAATTCGCCAGAGGCAAAGTGGTTCGTTTCATCTAAA
79 hrIleLeuTyrValAsnPheProLeuGluAlaLeuProLeuThrThrProGluAspLeuA
3961 CGTGCCACAGTCTCAAACCAAGACAGTTGCGGCTTGGAGTCTTCATGAACAGCTTGTCT
59 rgAlaValThrGluPheTrpSerLeuGlnProLysSerAspGluHisValAlaGlnGluS
4021 GATAGGATTGTAATGTCCGATAAAATCGCCTGAATGCTCTGCATTGCCGAAAAATTTAAG
39 erLeuIleThrIleAspSerLeuIleAlaGlnIleSerGlnMetAlaSerPheAsnLeuT

UL5

4081 TAAACAGGAGTGGTGATTTCTATTTCCCGCCTGCTCTTCCCCGAAAAATGGACATGCCATT
19 yrValProThrThrIleGluIleGluArgArgSerLysGlySerPheProCysAlaMet
4141 TTCCAATTGCGTCAGGTACC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N15/38 C12N15/45 C07K14/03 C07K14/055
C07K14/125 C07K14/165 A61K39/17 A61K39/215 A61K39/245
A61K39/255

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 719 864 A (RHONE MERIEUX) 3 July 1996 see column 16, line 43 - line 50 ---	1-17
A	EP 0 477 056 A (RHONE MERIEUX) 25 March 1992 see the whole document ---	1-17
A	WO 96 29396 A (SYNTRO CORP ; WILD MARTHA A (US); COCHRAN MARK D (US)) 26 September 1996 page 5, 19 ---	1-17
A	WO 90 02803 A (RHONE MERIEUX) 22 March 1990 see the whole document ---	1-17
A	FR 2 728 794 A (RHONE MERIEUX) 5 July 1996 see the whole document ---	1-17

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 June 1998

Date of mailing of the international search report

10/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-2045

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 21034 A (RHONE MERIEUX ;AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRANC (FR); BUBLOT MICHEL) 11 July 1996 see the whole document ---	1-17
A	FUCHS, W. AND METTENLEITNER, T.C.: "DNA SEQUENCE AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE UL1 TO UL5 GENE CLUSTER OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, 1996, pages 2221-2229, XP002041411 cited in the application see the whole document ---	1-17
A	CHEN, B.-F., ET AL.: "CHARACTERIZATION OF A BICISTRONIC RETROVIRAL VECTOR COMPOSED OF THE SWINE VESICULAR DISEASE VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, April 1993, pages 2142-2148, XP002041412 see the whole document -----	8-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02307

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0719864	A	03-07-1996	FR 2728795 A	05-07-1996
			AU 4071595 A	11-07-1996
			CA 2166367 A	01-07-1996
			JP 9020682 A	21-01-1997
EP 0477056	A	25-03-1992	FR 2666589 A	13-03-1992
			AU 657488 B	16-03-1995
			AU 8370891 A	12-03-1992
			CA 2050850 A	08-03-1992
			JP 5168473 A	02-07-1993
WO 9629396	A	26-09-1996	AU 5369096 A	08-10-1996
			CA 2216139 A	26-09-1996
			EP 0822980 A	11-02-1998
WO 9002803	A	22-03-1990	AU 633272 B	28-01-1993
			AU 4214289 A	02-04-1990
			AU 629248 B	01-10-1992
			AU 4325089 A	02-04-1990
			EP 0434721 A	03-07-1991
			EP 0434747 A	03-07-1991
			EP 0748631 A	18-12-1996
			WO 9002802 A	22-03-1990
			IL 91627 A	31-08-1995
			IL 113339 A	18-03-1997
			JP 4501658 T	26-03-1992
			JP 4502852 T	28-05-1992
			US 5558860 A	24-09-1996
FR 2728794	A	05-07-1996	AU 4063095 A	11-07-1996
			CA 2166371 A	01-07-1996
			EP 0728842 A	28-08-1996
			JP 8337539 A	24-12-1996
			US 5733554 A	31-03-1998
WO 9621034	A	11-07-1996	AU 4489896 A	24-07-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 97/02307

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6	C12N15/86	C12N15/38	C12N15/45	C07K14/03	C07K14/055
	C07K14/125	C07K14/165	A61K39/17	A61K39/215	A61K39/245
	A61K39/255				

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 719 864 A (RHONE MERIEUX) 3 juillet 1996 voir colonne 16, ligne 43 - ligne 50 ---	1-17
A	EP 0 477 056 A (RHONE MERIEUX) 25 mars 1992 voir le document en entier ---	1-17
A	WO 96 29396 A (SYNTRO CORP ; WILD MARTHA A (US); COCHRAN MARK D (US)) 26 septembre 1996 page 5, 19 ---	1-17
A	WO 90 02803 A (RHONE MERIEUX) 22 mars 1990 voir le document en entier ---	1-17
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

"Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/06/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.

Fonctionnaire autorisé

Holtorf C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No

PCT/FR 97/02307

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 728 794 A (RHONE MERIEUX) 5 juillet 1996 voir le document en entier ----	1-17
A	WO 96 21034 A (RHONE MERIEUX ; AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRANC (FR); BUBLOT MICHEL) 11 juillet 1996 voir le document en entier ----	1-17
A	FUCHS, W. AND METTENLEITNER, T.C.: "DNA SEQUENCE AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE UL1 TO UL5 GENE CLUSTER OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, 1996, pages 2221-2229, XP002041411 cité dans la demande voir le document en entier ----	1-17
A	CHEN, B.-F., ET AL.: "CHARACTERIZATION OF A BICISTRONIC RETROVIRAL VECTOR COMPOSED OF THE SWINE VESICULAR DISEASE VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 4, avril 1993, pages 2142-2148, XP002041412 voir le document en entier -----	8-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux n. de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/02307

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0719864 A	03-07-1996	FR 2728795 A	05-07-1996
		AU 4071595 A	11-07-1996
		CA 2166367 A	01-07-1996
		JP 9020682 A	21-01-1997
EP 0477056 A	25-03-1992	FR 2666589 A	13-03-1992
		AU 657488 B	16-03-1995
		AU 8370891 A	12-03-1992
		CA 2050850 A	08-03-1992
		JP 5168473 A	02-07-1993
WO 9629396 A	26-09-1996	AU 5369096 A	08-10-1996
		CA 2216139 A	26-09-1996
		EP 0822980 A	11-02-1998
WO 9002803 A	22-03-1990	AU 633272 B	28-01-1993
		AU 4214289 A	02-04-1990
		AU 629248 B	01-10-1992
		AU 4325089 A	02-04-1990
		EP 0434721 A	03-07-1991
		EP 0434747 A	03-07-1991
		EP 0748631 A	18-12-1996
		WO 9002802 A	22-03-1990
		IL 91627 A	31-08-1995
		IL 113339 A	18-03-1997
		JP 4501658 T	26-03-1992
		JP 4502852 T	28-05-1992
FR 2728794 A	05-07-1996	US 5558860 A	24-09-1996
		AU 4063095 A	11-07-1996
		CA 2166371 A	01-07-1996
		EP 0728842 A	28-08-1996
		JP 8337539 A	24-12-1996
WO 9621034 A	11-07-1996	US 5733554 A	31-03-1998
		AU 4489896 A	24-07-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.